

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**ATPasa de la membrana de Escherichia coli K-12 :
solubilización, purificación parcial y cinética de la enzima
soluble y asociada a la membrana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Carreira Garea

Madrid, 2015

T 579.22
CAR
atp

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

SECCION DE BIOLOGICAS

BIBLIOTECA UCM



5305314848

ATPasa DE LA MEMBRANA DE ESCHERICHIA COLI K-12.
SOLUBILIZACION, PURIFICACION PARCIAL Y CINETICA
DE LA ENZIMA SOLUBLE Y ASOCIADA A LA MEMBRANA



MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

presenta

JOSE CARREIRA GAREA

R.- 20.417

Madrid, 1974

Como portada de mi tesis quiero manifestar mi más sincero agradecimiento al Dr. Emilio Muñoz por su constante estímulo e incansable apoyo durante la confección del presente trabajo; a mis compañeros de laboratorio; al Instituto de Biología Celular, División de Ciencias y Formación de Personal Investigador por su ayuda económica.

Deseo asimismo agradecer al Dr. Angel Martín Municio el haber aceptado amablemente la ponencia de esta tesis.

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	
MATERIALES Y METODOS	66
Cultivo de <u>E.coli</u> y preparación de membranas	66
Ensayo de actividad	72
Inhibición por ADP y Pi	74
Electroforesis en geles de poliacrilamida	75
Purificación de ATPasa soluble	76
Solubilización de NADH-deshidrogenasa	77
Estabilidad de ATPasa soluble	79
Fijación de ATP	81
RESULTADOS	84
Solubilización de la ATPasa de <u>E.coli</u>	85
Estimulación de la ATPasa por tripsina	99
Acción proteolítica de la tripsina sobre la ATPasa	104
Solubilización de la NADH-deshidrogenasa	108
Estabilidad de la ATPasa soluble	115
Purificación de ATPasa soluble y caracterización electroforética	127
Cinética de ATPasa de <u>E.coli</u>	132
Efecto de la concentración de ATPasa en la velocidad de reacción	133
Relación entre concentración de Mg^{2+} y ATP para una activi- dad enzimática óptima	138

	<u>Pág.</u>
Cinética de saturación de sustrato	142
Cinética de saturación de ATP	156
Cinética de saturación de Magnesio	158
Inhibición de ATPasa de <u>E. coli</u> por ADP y Pi	164
Inhibición por diciclohexilcarbodiimida	180
Inhibición por azida de sodio	182
Efecto de la temperatura sobre la ATPasa de <u>E. coli</u> . . .	185
Fijación de ATP a la ATPasa	195
DISCUSION	199
CONCLUSIONES	236
BIBLIOGRAFIA	238

ABREVIATURAS

SDS	-	Dodecil sulfato sódico
EDTA	-	Etilendiamina tetraacetato disódico
NADH	-	Nicotinamida adenina dinucleotido reducido
ANS	-	8-anilino-1-naftaleno sulfonato
TDF	-	Fluoroborato de trimetilamonio diazobenceno
ATP	-	Adenosina trifosfato
ATPasa	-	Adenosina trifosfatasa
ADP	-	Adenosina difosfato
Pi	-	Fosfato
DCIP	-	2,6-diclorofenolindofenol
DCCD	-	Diciclohexilcarbodiimida

INTRODUCCION

Toda célula de cualquier origen y naturaleza, se encuentra rodeada de una envoltura que recibe el nombre de membrana celular, pero esta afirmación tan importante y en apariencia sencilla, no tuvo existencia en la literatura científica hasta la segunda mitad del siglo XIX. Fué Nageli (1) quien, con métodos ópticos de observación directa, pudo aseverar por vez primera que las células tenían un límite discreto que las envolvía y les proporcionaba individualidad, al mismo tiempo que controlaba, de alguna manera, el trasiego de sustancias desde el interior y el exterior de la célula. Ya en las postrimerías de la pasada centuria Pfeffer (2) y Overton (3) realizaron extensas experiencias sobre la permeabilidad de la célula a no electrolitos, a través de las cuales comprobaron ampliamente la existencia de una membrana plasmática y descubrieron alguna de sus propiedades. Las características de permeabilidad les llevaron a la conclusión de que el colesterol y otros lípidos debían estar implicados en el proceso de difusión de sustancias a través de la membrana, y por consiguiente serían de algún modo constituyentes de la misma membrana.

En las primeras décadas de nuestro siglo, Chambers (4) y más tarde Plowe (5) establecieron definitivamente la existencia de la membrana celular, y sugirieron que su estructura debía ser fluida y elástica. Las técnicas que les llevaron a estas conclusiones estaban

basadas en minuciosas micromanipulaciones con huevos de estrellas de mar y células vegetales de diversa naturaleza.

Con estos logros científicos y otros paralelos quedaba fuera de duda la presencia de una membrana plasmática en el límite exterior de toda célula, pero su naturaleza continuaba siendo una incógnita. Los primeros atisbos sobre este problema fueron debidos a Overton (3) quien preanunció que distintas moléculas lipídicas y el colesterol debían ser integrantes de la envoltura celular. Sin embargo la primera aportación realmente interesante no llegó hasta 1925. Gorter y Grendel (6) extrajeron los lípidos de eritrocitos y los extendieron sobre una superficie acuosa formando una monocapa. Compararon la superficie de la monocapa con la superficie del eritrocito, lo que les permitió deducir que los lípidos extraídos deberían formar una bicapa en la membrana celular.

Estudios de tensiones superficiales rindieron valores más bajos que los esperados para superficies lipídicas, en tanto que proteínas solubilizadas eran capaces de asociarse espontáneamente con monocapas de lípidos en una interfase agua - aire (7). Estas dos afirmaciones indujeron a Danielli y Davson (8) a suponer que la estructura de membrana biológica estaba compuesta de una bicapa lipídica con las superficies hidrofóbicas en aposición y las polares hacia el exterior e interior de la célula, pero recubiertas de moléculas proteicas. Múltiples problemas surgidos del estudio de permeación celular

impusieron pronto una revisión de este modelo, y ya en 1956 Stein y Danielli (9) admitieron la existencia de poros de naturaleza proteica que atravesarían la membrana, dando así una solución a las dificultades de transporte facilitado. Esta solución estaba implícitamente contenida en el primitivo modelo, como una necesidad de la fisiología celular, aunque su mecanismo no había encontrado la oportuna formulación (10).

La aparición de las técnicas de microscopía electrónica proporcionó pronto un notable acervo de conocimientos acerca de la morfología de la membrana. Con independencia del material estudiado, las imágenes presentadas por los distintos observadores, ofrecían una perfecta identidad. Una zona de baja densidad ocupaba el centro de la membrana a un corte transversal y dos zonas de mayor densidad la recubrían a ambos lados. El espesor total se aproximaba a los 10 nm. Robertson (11) identificó este comportamiento común de toda membrana con el modelo de Danielli y Davson, y le dió el nombre de unidad de membrana. La idea de la identidad esencial de toda membrana biológica fué extendida también a organos subcelulares, algunos de los cuales presentaban una envoltura que era la continuación de la misma membrana celular.

El perfeccionamiento de las técnicas microscópicas permitió introducir nuevas variantes. El descubrimiento de discontinuidades en las zonas clara o densa de la membrana hizo suponer la existencia de unidades de estructura globular dentro de la membrana (12), y la

comprobación de aspectos particulados en las crestas mitocondriales sugirió la posibilidad de una membrana de estructura particulada (13). Al mismo tiempo surgieron voces desde el campo especulativo que abogaban por una distribución micelar de los lípidos, al menos parcial, en contraposición a la laminar defendida por Danielli y Davson (14).

Métodos bioquímicos suaves de disgregación de membranas aportaron evidencias sobre la existencia de subunidades discretas de partículas lipoproteicas, algunas de las cuales estaban dotadas de actividad biológica, y que convenientemente manejadas eran capaces de regenerar un aparente aspecto de membrana.

Estos hallazgos llevaron a Green y col. (15) a la afirmación de que "toda la experiencia bioquímica conduce a la tesis de que los sistemas macromoleculares están contruidos de unidades repetitivas". Los trabajos de Green fueron efectuados en mitocondria, pero las conclusiones han sido generalizadas, y la idea de la subunidad, mantenida, aun dentro de la gran heterogeneidad de partículas lipoproteicas, proporcionada por el tratamiento con detergentes de distintas membranas biológicas.

Las ideas actuales sobre la constitución de la membrana biológica son abordadas desde dos campos netamente diferentes aunque similares en importancia; las modernas técnicas fisicoquímicas y las aportaciones teóricas de la ciencia actual sobre todo la termodinámica. Estudios de resonancia nuclear magnética (16), y de disper

sión rotatoria óptica y dicroísmo circular (17) con membranas de eritrocitos, indujeron a pensar que parte de las proteínas de membrana se encontraban envueltas en un ambiente no polar, hecho que contradecía la hipótesis de Danielli y Davson. Técnicas de criocorrosión - aplicadas a tejidos biológicos han apuntado la probabilidad de que el - centro de la membrana no está enteramente ocupado por las cadenas parafínicas de las dos monocapas de lípidos, sino también por proteínas de estructura globular (18). Dentro de las limitaciones impuestas por el método experimental parece correcto pensar que algunas proteínas atraviesan la membrana de parte a parte y otras aparecen como incrustadas dentro de la zona hidrofóbica sin que alcancen todo el espesor de la membrana.

Estos resultados expresarían una nueva concepción de la - membrana, bicapa lipídica con interrupciones totales o parciales de - proteínas globulares a lo largo de toda su superficie. Tal idea que - puede considerarse anticipada en los poros protéicos de Stein y Danielli (9) ha encontrado un notable apoyo en los estudios de difracción de rayos X (19) y en estudios de modificación de componentes - de lípidos de membrana (20). Según esta información un 30% de la - capa lipídica de la membrana de eritrocitos está interrumpida por material protéico. No tenemos un conocimiento preciso de cómo las proteínas se intercalan con los lípidos, no obstante métodos de marcaje de proteínas de membrana nos han confirmado en la opinión de que - unas se encuentran específicamente en la cara interior, otras solo en la exterior y otras están presentes en las dos (21).

El modelo Danielli y Davson suponía que la parte hidrofóbica de los lípidos ocupaba el centro de la membrana y la parte iónica se encontraba recubierta por capas de proteína. Es indudable que los lípidos interaccionan entre sí como lo demuestran las transiciones de fase comprobadas en Acholeplasma laidlawii (22, 23), Escherichia coli (24, 25) y membranas de organismos superiores (26, 27). Fenómeno radicado en una interacción directa y cooperativa de las cadenas hidrocarbonadas, de gran número de carbonos (28). Pero este fenómeno es independiente del estado de monocapa o bicapa que pueden adoptar los lípidos, ya que transiciones de fase ocurren igualmente en materiales hidrocarbonados puros (29).

Aproximaciones con difracción de rayos X (19) y marcadores de spin (30) han aportado una considerable evidencia en favor de la formación de bicapas en un notable número de membranas biológicas. Entre un 80 y un 84% de la fracción de lípidos en probable estado de bicapa han sido calculados para Acholeplasma (31) y retículo sarcoplásmico de músculo de conejo, respectivamente (32). Medidas fluorimétricas con membranas de E. coli (33) han rendido un 80% de lípidos totales que participan en la transición de fase y un 42,5% de lípidos de membrana que al mismo tiempo participan en la transición de fase y son accesibles al 1-anilino naftaleno-8-sulfonato desde la fase acuosa. El 20% de lípidos que no participan en la transición de fase deben estar íntimamente acoplados a las moléculas protéicas inte-

grantes de la membrana. Estos resultados experimentales apoyan la idea de que una gran cantidad de lípidos se encuentran en forma de b́capa, pero también ponen de manifiesto que un tanto por ciento no despreciable son accesibles a la fase acuosa, lo que contradice los primitivos esquemas de la estructura de la membrana.

Consideraciones de tipo teórico y en especial termodinámico, han impuesto una serie de condiciones a cualquier intento de modelo estructural, simplemente basádo en hechos experimentales (34, 35, 36). - Estas consideraciones son aplicadas a la membrana como consecuencia de una extrapolación de estudios detallados, llevados a cabo con sistemas macromoleculares más sencillos. Como principio se admite que toda disposición espacial de los constituyentes de una membrana biológica ha de ser tal, que represente un estado estacionario, con un mínimo de energía libre. De aquí podemos concluir siguiendo a Singer (34), que todos los grupos iónicos y altamente polares dependientes de lípidos o de proteínas deberán estar en contacto con la fase acuosa, que las cadenas paraf́nicas de los ácidos grasos y los residuos no polares de los aminoácidos deberán encontrarse alejados del agua, llevando al máximo sus interacciones hidrofóbicas y que deben estar altamente favorecidos todos los enlaces de hidrógeno cuyos integrantes no están en contacto con el agua.

A la luz de las aportaciones experimentales a que hemos hecho referencia y de las restricciones termodinámicas que acabamos de enumerar, ha perdido validez el modelo de Danielli y Davson que no

se ajusta a la distribución de proteínas y lípidos que imponen los con-
ci-mientos modernos, ni representa un estado de energía libre mínima.
 Con la idea de dar satisfacción a las imposiciones de los nuevos ade-
lan-tos científicos nació el modelo de Benson (37) en 1968. Suponía la
 distribución de las proteínas en forma globular a lo largo de todo el in-
ter-ior de la membrana, mientras que los lípidos, cuyos grupos pola-
 res estarían en contacto con el agua, intercalaban sus cadenas para-
 fínicas con las cadenas de las proteínas. Este modelo justifica satisfac-
 toriamente los requerimientos termodinámicos, pero contradice los co-
no-cimientos actuales sobre la disposición de los lípidos (19, 30, 31,
 32, 33). Es un hecho sostenido por una amplia base experimental -
 que un elevado tanto por ciento de lípidos de membrana se encuentran
 en forma de bicapa. Por esta razón el modelo de Benson no parece
 dar cuenta de una organización de los componentes de la membrana,
 que refleje lo que ocurre en la realidad.

En el momento actual solo existen dos modelos de membrana
 que recogen las aportaciones más recientes de la ciencia en una
 compleja organización macromolecular y termodinámicamente dotada -
 con la máxima estabilidad dentro del medio acuoso en que se encuen-
tra toda célula viva. Estos modelos son debidos a Green y Singer.
 El primero fué propuesto inicialmente el año 1966 (38, 15) y revisa-
do con posterioridad en varias ocasiones (39, 36). El de Singer data
 en su forma primitiva del mismo año (40) pero en sucesivas revisio-
 nes ha sufrido una notable transformación (41, 34, 35). En su última

forma de expresión el modelo de Green (36) ha sido denominado por su autor como modelo de unidades repetitivas de estructura y función y el de Singer (35) como modelo de mosaico fluido. Ambos coinciden en aspectos esenciales, si bien difieren ampliamente en muchos detalles concretos. Como puntos de coincidencia podemos enumerar los siguientes:

- a) Clasificación de las proteínas de membrana en intrínsecas y extrínsecas (42) o integrales y periféricas (35). Las proteínas extrínsecas o periféricas se caracterizan por su solubilización molecular con tratamientos suaves como cambios de fuerza iónica y agentes quelantes, por su fácil solubilidad en solventes acuosos y por la ausencia de lípidos asociados. Las intrínsecas o integrales requieren tratamientos drásticos para disociarlas de la membrana, frecuentemente están asociadas con lípidos y son poco solubles en solventes acuosos. Solo las proteínas mencionadas en segundo lugar se consideran constituyentes integrantes de la estructura de la membrana biológica.
- b) Las proteínas intrínsecas son bimodales (36) o anfipáticas (35). Se trata de proteínas globulares con una elevada proporción de estructura α -hélice (43); los grupos superficiales de un extremo polares y los del otro esencialmente no polares. La región polar comprende, además de los restos iónicos de aminoácidos, los residuos altamente polares de los azúcares unidos a las proteínas.
- c) Las interacciones predominantes en la membrana, al menos cuan-

titativamente, parecen ser de proteínas con proteínas y de lípidos con lípidos. Esto no quiere decir nada en merma de las interacciones lípido-proteína, cuya combinación confiere estabilidad a la membrana. Así lo demuestra el hecho de que los fosfolípidos se combinan rápidamente con proteínas de membrana libres de lípidos (44). Tampoco contradice la experiencia de que enzimas unidos a membrana y antígenos necesiten de fosfolípidos específicos para su actividad (45), ni la de que la naturaleza de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos tengan efectos sobre la función de algunas proteínas ligadas a membranas bacterianas (46). Solo quiere reafirmar que la mayor proporción de lípidos constituidos en bicapa no se emparejan fuertemente con las proteínas de la membrana en tanto que una fracción menor mantiene interacciones más fuertes y específicas con determinadas proteínas.

Una vez reseñados estos puntos de convergencia de los dos modelos, presentaremos las notas esenciales de cada uno en particular.

El modelo de mosaico fluido considera la membrana como un mosaico en el que las moléculas protéicas globulares que pueden ser lipoproteínas o glicoproteínas alternan con secciones de bicapas fosfolípicas. Por su naturaleza anfipática las proteínas son asimétricas estructuralmente. Una molécula integral de proteína con su forma, tamaño o agregado de proteínas estructurales puede atravesar toda la membrana, teniendo entonces dos regiones en contacto con la fase acuosa de ambos lados. De acuerdo con esto, la diferencia entre proteínas no es

obstáculo para que sean integrantes de membrana, siempre que su composición de aminoácidos les permita adoptar una estructura anfipática. - Razón que vale igualmente para distinguir proteínas de membrana de - proteínas periféricas o simplemente solubles. Los lípidos en el modelo forman fundamentalmente bicapas interrumpidas, con los grupos iónicos en contacto con la fase acuosa, aunque una pequeña porción de ellos - debe estar íntimamente asociada con las proteínas integrales. Las interacciones proteína-proteína ocurren entre componentes integrales y periféricos, o entre subunidades de proteínas integrales con formación de un agregado complejo. La matriz de la membrana está constituida en esencía por los lípidos. El espesor de la membrana puede ser variable, - desde la zona compuesta sólo de lípidos a la que está constituida por proteínas. El promedio del espesor coincide en todo caso con los datos experimentales.

Esta sucinta exposición permite entrever una membrana dinámica, funcional, ausente de rigidez, que da razón de todos los datos experimentales observados y que está de acuerdo con las consideraciones termodinámicas anteriormente anunciadas.

Las ideas básicas del modelo de unidades repetitivas de estrutura y función podemos reducirlas a los siguientes puntos enumerados por su propio autor (36): a) Las proteínas intrínsecas son bimodales; b) grupos de proteínas intrínsecas forman complejos que son las unidades de estructura y función; c) las membranas están compuestas por "dominios" de proteínas y lípidos interconectados; d) los

"dominios" de proteína son grupos de complejos asociados; e) complejos asociados con fosfolípidos forman las unidades de biogénesis de membrana; f) los dominios de proteínas proporcionan la base estructural para la cooperatividad de la membrana; g) el complejo que es la unidad última de la membrana, es posiblemente el lazo de unión entre el proceso hereditario y la misma membrana; h) la estructura de los complejos es la responsable de la mayoría de los procesos químicos y físicos de la membrana.

Estas afirmaciones implican que la membrana está integrada por grandes extensiones de complejos lipoprotéicos asociados unos a continuación de otros que constituyen los dominios de la proteína. - Areas inmediatas de membrana están compuestas totalmente de lípidos en forma de bicapa que son los dominios de los lípidos. Una sucesión alternante de dominios completa la estructura de la membrana. El orden de las proteínas dentro del complejo es esencial y determinado genéticamente, de tal manera que las proteínas individuales nunca constituyen una unidad de estructura, de función o de biogénesis.

Green es consciente de la rigidez de este modelo, por ello admite como posible ciertas variaciones en la estructura de las subunidades del complejo e incluso en la geometría de los dominios protéico y lipídico. Admite también que, aunque los complejos son las unidades repetitivas del dominio de la proteína, puedan existir proteínas intrínsecas individuales dotadas de movilidad a través de los dominios de los fosfolípidos.

La disposición general de todos los componentes de la membrana se adecua perfectamente a las exigencias experimentales y a las consideraciones termodinámicas, al igual que en el modelo de mosaico fluido. Sin embargo presentan algunas diferencias que vamos a consi-
derar.

Las proteínas integrales de Singer se distribuyen a lo lan-
go de la membrana formando complejos de distintos tamaños o incluso estando aisladas en la bicapa de lípidos, sin más exigencias de orde-
namientos. Las proteínas intrínsecas de Green se integran en comple-
jos bien definidos y éstos en dominios con características inmanentes
e incambiables.

El modelo de Green supone una unidad base de considera-
ble complejidad que constituye el bloque mínimo con el cual se edifica
la membrana. El modelo de mosaico fluido no precisa ninguna entidad
especialmente elaborada para la construcción de la membrana. Las -
proteínas integrales (lipoproteínas o glicoproteínas) son el soporte de
todo el edificio.

Los fenómenos cooperativos encuentran en el modelo de -
Green una fácil explicación. La membrana total puede considerarse co-
mo un macrooligómero cuyos protómeros son los complejos. Con esta
aproximación los procesos cooperativos pueden ser rápidos y eficaces.
Green admite dos tipos posibles de cooperatividad, entre las proteínas
del complejo y de los complejos entre sí. El modelo del mosaico se -
aparta de las características de simetría que impone la teoría alostérica
de Monod y col. (47). El mecanismo cooperativo ha de buscar su ex

plicación en la fluidez de la membrana que permite la movilidad translacional de las proteínas integrales.

Con estas acotaciones últimas creemos haber mencionado los puntos más relevantes de ambos modelos de membrana, ya que no era nuestro intento hacer una exposición detallada de ellos. Sólo hemos querido presentar sus líneas generales, sus aspectos más sobresalientes.

Tras una rápida visión de los primeros esfuerzos por detectar la existencia de una membrana celular y por descubrir las integrantes más elementales que la componen, hemos presentado de forma somera los modelos más significativos y sus constantes revisiones impuestas por las nuevas aportaciones de la ciencia. Así llegamos al modelo unitario de estructura y función y al modelo en mosaico fluido. Con ello hemos intentado que los nuevos aspectos del estudio de la membrana que vamos a presentar encuentren en esta exposición su base y su natural punto de partida.

La estructura de membrana que acabamos de exponer, constituye el modelo universal, y normalmente el único límite que separa el citoplasma celular del ambiente exterior. Pero esto solo acontece en los organismos más desarrollados. La necesidad de reunir en un organismo unicelular muchas funciones que, en seres superiores desempeñan células especializadas, y de mantener la supervivencia frente a ambien-

tes de diverso grado de hostilidad, ha orientado la evolución hacia la formación de complejos sistemas cuya estructura y función están íntimamente relacionadas con la membrana del microorganismo. Así nos encontramos con la enorme complejidad de la envoltura de las bacterias Gram negativas. Desde los primeros estudios morfológicos (48, 49) y bioquímicos (50), quedó bien patente la diversidad de estructuras y componentes que la integran. Esencialmente estudiada en E.coli, presenta una imagen multilaminar. Al microscopio electrónico ofrece el aspecto de poseer dos unidades de membrana, una exterior y otra interior. Pero la realidad es todavía más compleja puesto que entre ambas membranas se encuentra una capa intermedia, responsable probablemente de la forma de la bacteria, e implicada en interacciones con una zona lipoprotéica que la envuelve.

Partiendo del exterior de la bacteria hacia el interior, podemos distinguir las siguientes estructuras bien caracterizadas:

a.- Un complejo formado por lipopolisacáridos, lípidos y proteínas.

Sus cadenas lipopolisacáridicas constituyen los límites más externos de la superficie celular (51) y son responsables de propiedades antigénicas. Este complejo representa la membrana exterior.

b.- Una capa de lipoproteínas, relacionadas con la membrana externa mediante abundantes interacciones de carácter iónico e hidrofóbico.

c.- Un peptidoglicano semejante al de las gram positivas, rígido y covalentemente ligado a la lipoproteína (52).

d.- Una membrana plasmática, responsable de gran número de funciones biológicas y expresión de la membrana celular tipo.

La entidad más recientemente descubierta es la capa lipoprotéica cuya función es poco conocida, aunque se piensa que debe jugar un importante papel en la unión del lipopolisacárido a los restantes componentes superficiales (53).

El término pared, aplicado a bacterias gram negativas, comprende la membrana exterior, la capa lipoprotéica y el peptidoglicano. La trabazón de estas tres entidades está asegurada a través de las lipoproteínas intermedias.

El conocimiento de cuál fuera la naturaleza de cada una de estas estructuras ha chocado siempre con la misma dificultad; obtener las aisladas de las demás. El progreso de las técnicas de separación y fraccionamiento de los últimos años, nos ha permitido descorrer un poco el velo de nuestra ignorancia y adquirir una ligera comprensión de la verdadera realidad de tales estructuras.

Forsberg y col. (54, 55) aislaron y cuantificaron tres capas de la pared de una Pseudomona marina. De afuera adentro las denominaron capa débilmente unida, doble estructura exterior y capa subyacente. En conjunto incluían todos los componentes de la pared a excepción de peptidoglicano y daban cuenta del 5.8, 8.7 y 6.2% del peso seco de la bacteria, respectivamente. Todas poseían proteínas aunque en distintas proporciones, siendo la más abundante la doble estructura exterior. Las hexosaminas, en cambio, preponderaban en la capa débilmente unida, que

a su vez era la parte más pobre en contenido proteico. La composición en aminoácidos no mostraba diferencias aparentes de una fracción a otra.

Los resultados anteriores ofrecen una visión parcial de los componentes más exteriores de la envoltura, pero no permiten un estudio comparativo entre la membrana exterior e interior. Fue Miura y col. (56) quienes por vez primera dispusieron de fracciones enriquecidas en membrana interior y exterior. La primera presentaba la mayor proporción de lípidos y muchas enzimas consideradas como de membrana plasmática (ATPasa, succínico deshidrogenasa NADH_2 deshidrogenasa y citocromos) en tanto que la última estaba compuesta por una mayor cantidad de hidratos de carbono y carecía de marcadores de membrana citoplásmica. La cantidad de proteínas era semejante en ambas.

Cuando Schnaitman (57) analizó las proteínas totales de la envoltura de E.coli desnaturalizadas con SDS, se encontró con que el número de bandas de proteína oscilaba entre 20 y 30; pero existía una predominante, de peso molecular 44000, que respondía del 40% de toda la proteína solubilizada. Aunque con diferencias considerables de experimento a experimento, Shapiro y col. (58) y Siccardi y col. (59) obtienen unos patrones proteicos de envoltura de E.coli, cuyas bandas predominantes se encuentran alrededor de pesos moleculares de 30000, con notables variaciones dependiendo de las condiciones de solubilización. Al teraciones en la temperatura de desnaturalización por SDS de toda la envoltura bacteriana, ocasionan reagregación de bandas cercanas a una mayoritaria de peso molecular 48000, o el proceso inverso cuando la

temperatura desciende de 100 a 70°C (60). En cualquier caso el predominio de un determinado tipo de proteína de peso molecular próximo a 40000 parece fuera de duda. Urgía una separación de las fracciones interna y externa seguida de un análisis más riguroso de los componentes.

La técnica de Miura y col. (56) permitió a Schnaitman (61) preparar esas fracciones. El análisis de proteínas reveló 34 bandas en total, de las que 27 pertenecían a la fracción enriquecida en membranas y solo 7 a la fracción rica en componentes de pared. Entre estas siete se encontraba la de peso molecular 44000 que daba cuenta del 50% de las proteínas de esta fracción. La fracción de membrana contenía además de un tercio de la proteína total de la cubierta, la mitad de los fosfolípidos y las enzimas respiratorias. La fracción de pared estaba compuesta de los dos tercios restantes de proteína, alto contenido de lipopolisacáridos y fosfolípidos. Estos resultados permitían suponer que las imágenes que se tenían de la membrana exterior por microscopía electrónica, respondían a una verdadera estructura de membrana, si bien más simple que la plasmática, teniendo en cuenta la poca variedad de proteínas.

El paralelismo entre estos datos y otros logrados posteriormente en estudios similares es evidente. La separación de las membranas externa e interna de Salmonella typhimurium (62) permitió un nuevo análisis de sus componentes. La fracción de membrana externa contiene el 60% de la proteína total de la envoltura, el 50% de los fosfolípidos y el 90% de los lipopolisacáridos, en tanto que todos los enzimas de transporte de electrones se localizaron en la membrana plasmática. La com

posición de proteínas reveló que la membrana exterior presenta una mayor simplificación, con dos bandas mayoritarias de 32000 y 40000 daltones respectivamente. La síntesis de lipopolisacáridos tiene lugar en la membrana plasmática, ignorándose el mecanismo a través del cual se trasladan y ensamblan en la membrana exterior (63).

Seis bandas de proteína para la membrana exterior de E.coli y veinte para la plasmática son el resultado de nuevas determinaciones en este microorganismo (64). La proporción en peso, en que se encuentran los componentes más relevantes de la fracción externa, proteínas - fosfolípidos y lipopolisacáridos es de 100 : 82 : 34. Los mismos integrantes guardan una relación en la membrana interna de 100 : 86 : 11.

La existencia de dos membranas en bacterias gram negativas parece fuera de duda. Las experiencias de microscopía y composición química así lo indican. Sin embargo, las diferencias son evidentes. Predominio de lipopolisacáridos, simplificación en composición proteica y ausencia de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo energético y el transporte, son características que nos hablan de una mayor implicación de la membrana plasmática en las funciones biológicas de la célula.

Los trabajos de Forsberg y col. (54, 55) aportaban unos datos de capital interés; las interacciones de la membrana externa con los demás componentes y de sus integrantes entre sí, eran debidas a enlaces de tipo iónico a través de cationes divalentes y a fuerzas hidrofóbicas.

Manipulaciones con EDTA y Triton X-100, ya separadamente ya en combinación, sobre la fracción purificada de pared celular de E.coli, han permitido (65) corroborar las afirmaciones precedentes. Los enlaces que mantienen unida la pared celular son esencialmente de naturaleza no covalente. La organización de la pared depende de interacciones hidrofóbicas proteína-proteína y proteína-fosfolípido, y enlaces a través de cationes divalentes, en especial, entre proteínas y lipopolisacáridos.

Cuando Weidel y col. (66) aislaron el peptidoglicano encontraron que aparecía como tachonado de gránulo de proteína. Esa proteína ha sido estudiada ampliamente por Braun y col. (52, 53). Tiene un peso molecular de 7000 daltones, está unida covalentemente a un resto diaminopimélico del peptidoglicano a través de una lisina y representa sobre un 10% de la proteína total de la envoltura bacteriana. Es una lipoproteína a la que se atribuye un importante papel en el mantenimiento de la estructura de la pared, debido a las interacciones iónicas e hidrofóbicas que la relacionan con la membrana exterior.

La estructura que confiere su forma a la bacteria y le da solidez es la mejor conocida. Consta de un largo polímero en que se van alternando N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico, entrecruzados por cortos polipéptidos que se enlazan entre sí y con el grupo carboxilo del ácido N-acetil murámico. Weidel y col. (66) lo designaron con el nombre de mureína por analogía con proteína, pero actualmente

se prefiere denominarlo peptidoglicano por pensarse que describe mejor su naturaleza química (67). Cuantitativamente es menos importante que en bacterias gram positivas, pero sus propiedades y su función en la envoltura bacteriana son similares.

Con este breve recorrido hemos justificado la división de la envoltura de las bacterias gram negativas en sus cuatro estructuras fundamentales. La naturaleza química de cada entidad separada se ha ido perfilando, aunque quedan todavía grandes lagunas; la función está mucho menos precisada. De algunos componentes se dispone de experiencias que indican su posible actividad biológica. La integridad de los lipopolisacáridos hace a la bacteria resistente, al menos parcialmente, a la actinomicina D (68) y otros agentes antibacterianos (69), mientras que la destrucción del complejo la sensibiliza (70). De modo semejante los enzimas incluidos en el interior de la envoltura bacteriana que, la célula nunca excreta en condiciones normales, son liberados al exterior cuando el complejo lipopolisacárido se destruye.

Estos resultados inducen a pensar que el lipopolisacárido ejerce algún tipo de control sobre el paso de sustancias a través de la membrana externa.

Uno de los aspectos que tipifican la envoltura de las bacterias gram negativas está caracterizado por un conjunto de enzimas, en general degradativas, que se encuentran involucradas entre las distin-

tas capas de la superficie bacteriana. Denominadas por Mitchell (71) enzimas periplásmicas, se encuentran situadas entre el límite exterior de la membrana plasmática y la cara interna de la membrana exterior. Su asociación a la membrana o su estado de enzima libre es un problema sin resolver. Cuando la bacteria se convierte en extractos mediante abrasivos o sonicación las enzimas periplásmicas se localizan con las enzimas citoplásmicas en el sobrenadante de la centrifugación, incluso a velocidades a que sedimentan los ribosomas. Por otra parte existen métodos específicos que permiten aislar estas proteínas sin contaminantes citoplásmicos. El tratamiento de la bacteria con EDTA y lisozima en un medio isotónico permite la liberación de las enzimas periplásmicas como consecuencia de la rotura de la membrana externa (72). Efectos semejantes se consiguen depositando las bacterias en un medio de baja fuerza iónica que contenga EDTA (73). En ambos casos se aíslan las enzimas periplásmicas sin contaminantes del citoplasma por mantenerse intacta la membrana interna. Esto implica que tales enzimas se encuentran encerradas en el espacio comprendido entre las dos membranas bacterianas sin que sean excretadas al exterior ni pasen al citoplasma celular.

La relación de las enzimas periplásmicas con otros componentes del entorno periplásmico, su anclaje en la membrana interior, su unión al peptidoglicano o a las capas más exteriores, es un problema de difícil solución. Lo que sí parece claro es que tales enzimas no son citoplásmicas, no son parte integral de la membrana interna, ni se ex

cretan al exterior en los medios de cultivo. Varias experiencias apoyan esta afirmación.

Los trabajos histoquímicos de Nisonson y col. (74) con 5'-nucleotidasa y de Wetzel y col. (75) con fosfatasa alcalina y fosfodiesterasa, aunque no son decisorios, abogan por una localización periplásmica de las enzimas estudiadas. Existen diferencias evidentes en cuanto a la situación precisa de cada una de estas enzimas. Wetzel y col. encuentran la fosfatasa alcalina siempre en el espacio periplásmico al igual que la fosfodiesterasa; enzima esta última que había sido previamente localizada en la superficie celular. Nisonson y col. sitúan la 5'-nucleotidasa ligada a la superficie de la célula cuando ésta se halla intacta, pero la encuentran en el espacio periplásmico cuando la barrera de permeabilidad ha sido alterada. Estas diferencias, mas que reflejo de una situación real, son consecuencia de las variaciones introducidas por las técnicas de fijación, de tñido y sobre todo de integridad de los materiales biológicos empleados.

Actividades de fosfodiesterasa (cíclica), fosfatasa alcalina y otras fosfatasas han sido determinadas en células intactas, con sustratos que no pueden penetrar en el citoplasma bacteriano (76). La comparación de estas actividades con las obtenidas cuando las mismas enzimas habían sido liberadas del entorno periplásmico, ofreció una pequeña diferencia, sólo cuantitativa, y bastante variable de unas enzimas a otras; probablemente debida a la situación de la enzima en la envoltura

celular o bien a la dificultad de los sustratos para atravesar la zona de lipopolisacáridos.

Una serie de proteínas dotadas de la capacidad de fijar metabolitos específicos, como uno de los primeros pasos en el mecanismo de transporte, han sido localizados entre las capas de la pared celular. Pardee y col. (77) estudiaron la proteína de fijación del sulfato. La aplicación de anticuerpos de esta proteína a la bacteria intacta no alteró la capacidad de fijación del sulfato, pero la anuló totalmente cuando se aplicó a la proteína purificada. Un efecto semejante fué observado con la proteína de fijación de la leucina (78). Algunas de estas proteínas han sido purificadas (79), confirmada su especificidad por el ligando y su relación con sitios específicos de la membrana plasmática o bien de otras estructuras.

Como consecuencia de estas observaciones parece clara la existencia de un conjunto de enzimas y proteínas funcionales denominadas periplásmicas, cuya ubicación viene definida por la superficie externa de la membrana plasmática y la superficie interna de la membrana exterior.

Las bacterias Gram positivas no poseen enzimas periplásmicas pero excretan exoenzimas a los medios de cultivo de características muy similares. Las exoenzimas comprenden distintos tipos de toxinas y enzimas en general de acción degradativa. Han sido estudiadas fundamentalmente en Gram positivas del género Bacillus (80, 81).

Las células de mamíferos, en su simplicidad de membrana, no tienen posibilidad de un espacio periplásmico. Sin embargo, otras estructuras parecen desempeñar idéntica misión. Los lisosomas contienen cantidad de enzimas líticas y degradativas que se liberan cuando muere la célula y ocasionan su autólisis.

Esta triple semejanza ha permitido a De Duve y col (82) afirmar que la función más probable de las enzimas periplásmicas es la utilización, por parte de la célula, de todos aquellos materiales que siéndole útiles, no pueden atravesar la membrana citoplásmica.

Un papel protector contra el medio ambiente ha sido también sugerido como función primordial de estas enzimas (83).

Glazer y col. (84) han postulado que el papel de las enzimas periplásmicas es mantener un conveniente nivel de nucleótidos en la célula, pero esta hipótesis "aunque muy interesante" como dice Heppel, se apoya sobre demasiadas suposiciones y postulados.

Las superficies que limitan las células de organismos superiores están compuestas por un modelo universal de membrana simple, y continuo. Las bacterias también presentan esta unidad de membrana, esencialmente idéntica a la de cualquier otra célula, pero envuelta en una gran complejidad de otras estructuras. Hemos revisado someramente las capas que rodean a la membrana de bacterias Gram negativas y

descrito algunos detalles de su composición y morfología, en especial de la membrana externa. La membrana interior es una típica membrana plasmática en cuanto a la morfología y a la composición química. - Pero su existencia parece no estar limitada a recubrir la superficie celular con todas las funciones biológicas que eso lleva implicado. La presencia de sistemas membranosos dentro de la célula bacteriana es un hecho comprobado. Los primitivos cuerpos periféricos de Chapman y col. (85) fueron comprobados por Ryter y col. (86) e introducidos en la literatura científica con la denominación de mesosomas por Fitz-James (87). Los mesosomas han sido estudiados con preferencia en bacterias gram positivas por su mayor desarrollo y en consecuencia - su más amplia facilidad de detección y aislamiento; pero su presencia no es exclusiva de ningún tipo de microorganismos. Condiciones particulares de trabajo permiten descubrir estas estructuras en bacterias Gram negativas y estudiar sus características (88, 89).

La morfología de los mesosomas es variadísima. Se han - descrito como sistemas membranosos intracelulares o periféricos de - estructura tubular, vesicular, lamelar, bulbosa, y agregados de diversas formas (90). Existen una serie de factores que determinan este polimorfismo como son la edad de los cultivos (91), las condiciones fisiológicas y genéticas y los métodos de observación. Cultivos anaerobios del género *Bacillus* dan lugar a cambios morfológicos en los mesosomas (92) e incluso a la total desaparición (90). Inhibidores de - síntesis de proteínas y de otros polímeros como el cloramfenicol (93) y la cidoserina (94) alteran o destruyen su estructura. Cambios en el

medio de cultivo y en la síntesis de DNA se acompañan de variaciones morfológicas de los mesosomas (95).

Los estudios comparativos de la morfología de la membrana periférica y los mesosomas no coinciden en señalar la identidad o diversidad de ambas. Highton (92) determinó las dimensiones de las dos membranas por métodos microscópicos encontrando una pequeña diferencia que puede no ser significativa. Sin embargo, estudios más recientes con fracciones mesosomales purificadas de Micrococcus lysodeikticus (96) han probado que existen notables diferencias. Por técnicas de criocorrosión han demostrado en la membrana plasmática la existencia de depresiones cóncavas y convexas en las superficies de fractura y pequeñas estructuras alargadas, todas las cuales están ausentes en las membranas mesosomales. Las formaciones en varilla encontradas por estos autores habían sido ya ampliamente reseñadas y parecen tener un papel importante en el anclaje de la pared y la membrana bacteriana (97).

El examen de la composición química de la membrana periférica y mesosomal nos permite establecer nuevas diferencias entre las dos fracciones. Según Reavely (98) y Patch y col. (99), los patrones de electroforesis con proteínas de membrana y mesosoma de Bacillus, revelan solo una pequeña diversidad de bandas; sin embargo, Owen y col. (96) demostraron que en Micrococcus lysodeikticus el mesosoma tiene casi un 50% menos proteína que la membrana peri

férica, y que esta diferencia tenía su lógico reflejo en el menor número de polipéptidos detectables por electroforesis en gel.

La composición de lípidos de los mesosomas es poco conocida; sólo en algunos casos se pueden establecer comparaciones. Los trabajos de Thorne y col. (100) no encontraron diferencias de importancia, como tampoco los de Owen y col. (96) por lo que a lípidos extractables se refiere.

No obstante las diferencias son de importancia en cuanto al contenido de hidratos de carbono y carotenoides (101) al menos en Micrococcus lysodeikticus. La cantidad de hexosas de la membrana mesosomal es cuatro veces superior al de la membrana plasmática (94).

Si en este estudio comparativo nos referimos a marcadores con actividades enzimáticas específicas, la diferencia es drástica. Enzimas asociadas con el proceso respiratorio como NADH deshidrogenasa, succínico deshidrogenasa y malato deshidrogenasa se encuentran en la membrana celular y no en el mesosoma (96) (102). Sobre los citocromos existe alguna divergencia de criterios. Gel'man y col. (103) habían demostrado la presencia de los cuatro citocromos en preparaciones de membrana total, mientras Owen y col. (96) localiza el b556 en la fracción mesosomal.

Por último es de notar la gran cantidad de enzimas autofluorescentes encontradas en los mesosomas de Micrococcus lysodeikticus (96). La gran diferencia creada entre estos dos sistemas por la diversidad -

de marcadores, podría minimizarse suponiendo con Reusch y col. (104) que los mesosomas podrían tener las mismas cadenas polipeptídicas, pero en forma inactiva: hipótesis improbable y gratuita.

La función que estos sistemas membranosos pueden desempeñar en la bacteria es completamente incierta. Su participación en el proceso respiratorio y energético ha sido reclamada en ocasiones (90), pero los últimos estudios presentados más arriba parecen concluir que no son los mesosomas el lugar donde éstos se realizan, por carecer de los enzimas y complejos necesarios para tales procesos.

Se ha relacionado el mesosoma con la división nuclear (90), con la unión del núcleo a la membrana (105), con el crecimiento del septum de división celular (95). Sin embargo ninguna de estas funciones están comprobadas con evidencia, basándose los argumentos en pruebas indirectas, o simplemente en una relación espacial entre las funciones referidas y el mesosoma. Owen y col. (96) sugieren la posibilidad de que el mesosoma participe en la formación del septum abriendo el peptidoglicano, como una explicación a la presencia de las enzimas autolíticas que ellos encontraron.

Otras muchas funciones biológicas han querido relacionarse con la existencia de los sistemas mesosomales en bacterias. Entre ellas podemos citar la síntesis de la membrana (106), síntesis y secreción de exoenzimas y la síntesis de la pared. Desde su descubrimiento se ha pretendido implicar los mesosomas en la mayoría de los procesos

celulares, atribuyéndoles una importancia vital en la vida de la célula, comparable a la de la membrana plasmática. Sin embargo las experiencias posteriores no han podido confirmar los primeros presentimientos, y hoy día es muy poco lo que se puede afirmar con certeza acerca de su función en la bacteria. De tal manera es así que, Patch y col. (99) han cultivado Bacillus subtilis en condiciones en que un 80% no tenían mesosomas en fase exponencial y no obstante parecían totalmente funcionales. Esta diversidad de criterios da idea del desconocimiento que se tiene sobre esas membranas que se encuentran en todas las bacterias y cuyas funciones todavía no se han dilucidado.

La comprensión de la compleja estructura que rodea las bacterias gram negativas ha ido haciéndose realidad solo muy recientemente. El desarrollo que los métodos de fraccionamiento han experimentado en los últimos años fué la llave que abrió la posibilidad de describir uno tras otro, algunos de los componentes más caracterizados que se integran en el todo que constituye la envoltura celular.

Por esta razón, creemos de interés hacer una breve exposición, o mejor, presentar un pequeño muestrario de las técnicas empleadas en la separación de las fracciones dotadas de más acusada individualidad y de los resultados obtenidos con estas técnicas.

En 1958 Repaske (107) demostró que cuando las bacterias gram negativas se trataban con EDTA, se volvían altamente sensibles a pequeñas concentraciones de lisozima. La consecuencia de ambos efectos era la lisis del microorganismo. La causa era la destrucción de la pared celular, consiguiente formación de esferoplastos y rotura lítica de la membrana bacteriana. La sensibilidad osmótica del esferoplasto se podía minimizar manteniéndola en una disolución de sacarosa 0.5 M. Estas condiciones hipertónicas proporcionaban estabilidad al esferoplasto por un periodo de tiempo no bien definido, pero al menos de algunas horas. Estos hallazgos fueron la base de una gran parte de los trabajos posteriores sobre el fraccionamiento de envolturas bacterianas.

Nueve años más tarde Gray y col. (108) aislaron una fracción de membranas de Pseudomonas aeruginosa. Rompieron las células mecánicamente, separaron la fracción de la pared por centrifugación y obtuvieron por una ulterior centrifugación un sedimento que consideraron como una fracción de membrana. De hecho no contenía peptidoglucano ni ramosa y muy bajas cantidades de hidratos de carbono.

Los trabajos de Miura y col. (56) del año siguiente significaron un auténtico punto de partida. Prepararon esferoplastos por el método de Repaske (107) y los sometieron a centrifugación diferencial después de su lisis. El resultado fue la separación de tres bandas de distinta densidad. La más ligera contenía la fracción de membrana plasmática, la intermedia era una mezcla de las otras dos y la más pesada correspondía a los componentes de la pared. Esta afirmación venía

comprobada por el análisis de los componentes de cada banda. Marcadores de membrana como ATPasa, NADH deshidrogenasa y succínico deshidrogenasa se encontraban exclusivamente en la fracción más ligera mientras que los hidratos de carbono se localizaban preferentemente en la más densa y en cantidades menores a los otros. Las proteínas se distribuían sin preferencias y los lípidos abundaban más en la fracción de membrana interior.

Este procedimiento aportó un valioso medio para separar la membrana plasmática de una bacteria gram negativa de los restantes componentes que integran las demás capas de la cubierta. Sin embargo, el análisis de las fracciones obtenidas en gradiente de sacarosa, no fué lo suficientemente fino como para darnos certeza de una buena separación. Sustancias tan indicativas como heptosas, ácido cetodesoxioctulosónico y beta-hidroximirístico no fueron ensayados por los autores.

En 1969 Braun y col. (52) prepararon paredes de E.coli tratando las membranas con EDTA 0,1 M en agua destilada y manteniéndolas en agitación a 40°C. Seguidamente trataron algunas muestras con dodecil sulfato sódico, en caliente al 4%, centrifugaron a 78.000xg y lavaron el sedimento dos veces con agua; el sedimento estaba compuesto por peptidoglicano y lipoproteína. Otras muestras que habían estado en presencia de EDTA como las anteriores fueron centrifugadas, pero en ausencia de SDS. Tanto la fracción obtenida después de disolver las proteínas con SDS como la que conservaba la estructura de la membrana, fueron digeridas con tripsina. Los resultados demuestran

que mientras en la fracción no disgregada por el **SDS** la lipoproteína era separada del peptidoglicano en un tiempo de 20 min, en la fracción más simple, desnaturalizada por el detergente, necesitaba al menos 4 horas. Braun y col. explicaron esta diferencia por la mayor dificultad que encontraría la tripsina para digerir un sustrato desnaturalizado. Salvo esta divergencia los efectos de la tripsina eran idénticos. La lipoproteína se disociaba del peptidoglicano, dejando unida una lisina por cada diez unidades de repetición del mucopolímero, y sin romperse en trozos más pequeños aun en presencia de la proteasa. La lipoproteína dió un peso molecular de 7.000 daltones.

Cuando sustituían la tripsina por la pronasa se repetían efectos semejantes, pero en vez de una lisina, permanecían unidas al peptidoglicano una lisina seguida de una arginina (53).

Experiencias en que se digiere el mucopéptido con lisozima en ausencia de proteasas han concluido que cada molécula de lipoproteína arrastra dos unidades de disacáridos del peptidoglicano, y han probado además que la lisina está unida al carbono del ácido diaminopimélico (109).

Los trabajos de Braun y col. dejaron clara la existencia de un enlace covalente entre la capa de lipoproteínas, íntimamente ligado a la membrana externa, y el peptidoglicano, responsable de la forma y armazón rígido de la célula.

Con objeto de hacer un análisis global de todas las proteínas de la envoltura de E.coli Schnaitman (57) ideó un procedimiento para

solubilizarlas. Trituró las bacterias por medios mecánicos en presencia de ribonucleasa y desoxiribonucleasa, les añadió Cl_2Mg hasta una concentración 2 mM y los centrifugó a $5000 \times g$ para evitar la contaminación de células intactas y otros residuos. Les añadió Lubrol WX con el fin de eliminar todas las proteínas solubles, y los sedimentó a alta velocidad. La solubilización del sedimento se llevó a cabo con N,N'-dimetilformamida y ClH 0.1 M en proporción de 9:1, pH 2.3. Separó los lípidos por cromatografía en gel con el mismo solvente y eliminó el solvente por diálisis frente a una solución acuosa de urea.

El rendimiento de proteínas solubilizadas por este método frente a las proteínas totales de la envoltura celular fué de un 80%. Este rendimiento es bastante bueno si se tiene en cuenta que las lipoproteínas estudiadas por Braun y col. (52, 53) dan cuenta de un 10% de la proteína que envuelve la bacteria, y que no se disolvería por estar covalentemente unida al peptidoglicano, insoluble en dimetilformamida. El número de bandas encontradas oscila entre 20 y 30 con una mayoría de peso molecular 4400 que representa el 40% de la proteína total.

La separación de las membranas externa e interna fué llevada a cabo por el mismo autor (61) utilizando una variación del método de Miura y col. (56). Trituró las células como en el caso anterior y preparó los sedimentos de membranas y pared de la misma forma, sin adicionar Lubrol WX para no inactivar las enzimas. Muestras de esos sedimentos fueron analizadas en gradientes de sacarosa. En gradientes continuos o discontinuos se forman dos bandas; la más ligera

enriquecida en componentes de la membrana plasmática y la inferior com
puesta fundamentalmente de los integrantes de la pared celular propia-
mente dicha.

Los datos presentados por Forsberg y col. (54) con unas pseudomonas marinas son más complejos. Mediante tres lavados sucesi-
vos con ClNa 0.5 M obtienen una fracción que denominan capa externa
débilmente unida, rica en hexosaminas y cuya pérdida no supone cam-
bio morfológico en la bacteria. Otros tres lavados consecutivos con sa
carosa 0.5 M dan lugar a una fracción que centrifugada a $73.000 \times g$,
se desdobra en un sedimento que los autores denominan doble estructu
ra externa y un sobrenadante que constituye la capa subyacente.

Estas tres capas se pueden obtener también con repetidos
lavados con sacarosa 0.5 M.

La capa débilmente unida parece estar ligada a la envoltura
por puentes de cationes divalentes (Mg^{++}) puesto que cuando éstos no
existen se pierde en los lavados.

La doble estructura externa no se puede solubilizar con
 ClNa 0.5 M. Según los autores el Na^+ se intercambia con el Mg^{++} .
Esto rompe los puentes creados por el catión divalente pero todavía
evita la repulsión entre las cargas negativas por efecto del apantallamienu
to del Na^+ . Cuando el Na^+ es eliminado con lavados de sacarosa la do
ble capa externa se solubiliza. Si se trata con lisozima la bacteria pri
vada de estas tres capas se forman esferoplastos.

Forsberg y col. suponen que la capa subyacente está en contacto con el peptidoglicano. Si esto fuera verdad deberían eliminar con ella las lipoproteínas de Braun y col. (52. 53). Pero éstas están covalentemente ligadas al mucopéptido y no parece probable que se separen con sacarosa 0.5 M. Tampoco parece lógico concluir que la capa débilmente ligada no forma parte de la envoltura celular por el hecho de que no se advierta ningún cambio morfológico en la bacteria cuando se la elimina.

De Pamphilis (110) había demostrado que la membrana exterior de E.coli podría solubilizarse en parte con una mezcla de EDTA y Triton X-100. Siguiendo este mismo camino Schnaitman (65) trató la fracción enriquecida en pared celular que había obtenido por gradiente de sacarosa con Triton X-100 al 2%. El resultado fué un sedimento insoluble de pared celular que contenía toda la proteína de la pared, la mitad de los lipopolisacáridos y un sobrenadante de fracción de membrana, y un tercio de los lípidos. El sedimento insoluble, exento de contaminantes de membrana citoplásmica, fué insensible a la acción separada del EDTA y del Triton X-100, pero rindió en forma soluble la mitad de la proteína y todos los lipopolisacáridos y fosfolípidos restantes, cuando estos agentes se aplicaron conjuntamente. La acción de la lisozima sobre la fracción insoluble del Triton X-100, antes o después del tratamiento con EDTA - Triton X-100, dió lugar a la desaparición completa de toda estructura organizada, aunque no influyó en la solubilidad de las proteínas.

Las distintas fracciones separadas del conjunto de estructuras que envuelven la bacteria, por Forsberg y col. (54) y Schnaitman (65), pueden no ser homogéneas, ni responder a las funciones que se le atribuyen, pero una cosa dejan en claro y es que los complejos componentes que envuelven las bacterias gram negativas están ligados entre sí por enlaces fundamentalmente de tipo iónico e hidrofóbico. Esta conclusión concuerda con la creencia general de que las interacciones que mantienen la integridad de toda membrana, son interacciones no covalentes, sino del tipo de las encontradas en la envoltura más amplia de las bacterias gram negativas.

La semejanza entre la membrana interna y externa de las bacterias gram negativas es un problema que intriga y entusiasma cada vez más. Esta es la razón de que se describan nuevas aproximaciones para lograr una total separación de ellas, base de su estudio comparativo. Osborn y col. (62) aplicaron gradientes de sacarosa y separaron las membranas de Salmonella typhimurium. No partieron de envolturas trituradas, sino de esferoplastos obtenidos por las técnicas ya en uso, de EDTA y lisozima aplicadas simultáneamente. Los esferoplastos fueron rotos por lisis osmótica o sonicación, no mostrándose diferencias apreciables entre ambos métodos. Los gradientes de sacarosa corridos con los sedimentos de centrifugar los esferoplastos sonicados o lisados dieron lugar a cuatro bandas. La banda más pesada contenía casi todos los lipopolisacáridos, mientras estaban ausentes en las dos más ligeras.

Por el contrario las dos bandas superiores contenían los sistemas de transporte de electrones y los componentes de transporte de azúcares, al igual que otras actividades específicas de la membrana.

El incremento o disminución de las bandas intermedias dependía en gran parte de las condiciones de ensayo, sobre todo de la fuerza iónica.

Muy recientemente Sekizawa y col (64) separaron la membrana interna y externa de E.coli preparando los esferoplastos por el método de Miura y col. (56). Una vez formados los esferoplastos centrifugaron la mezcla a baja velocidad obteniendo la membrana externa en el sobrenadante y los esferoplastos como sedimento. A continuación los rompieron por lisis osmótica y sedimentaron las membranas citoplásmicas por centrifugación. Con este medio disponían de dos fracciones en que prevalecían los compuestos de la membrana citoplásmica o los de la exterior. Una separación posterior fué efectuada con gradientes de sacarosa. El resultado fué la formación de bandas cuyas características ya quedan definidas anteriormente.

Los resultados que acabamos de reseñar y otros similares obtenidos en los últimos seis años, nos dan una idea de la enorme importancia que para el conocimiento de la estructura y función de la envoltura celular, tienen las técnicas de separación y disociación de los componentes individuales o relacionados ya morfológica ya funcionalmente. Sin embargo, es todavía muy poco lo que se sabe con certeza sobre la intrincada arquitectura de esa capa que rodea las bacterias

gram negativas. Una de las fracciones de vital importancia que envuelven las bacterias gram negativas es sin duda su membrana plasmática. Esencialmente igual a cualquier membrana celular, su identidad física y sus complicadas funciones solo se pudieron conocer cuando se la aisló parcialmente del resto de los componentes celulares. Las técnicas empleadas en la preparación de membranas son variadas y los resultados también, al menos desde el punto de vista morfológico. Un sistema utilizado (111, 112) consiste en romper las células de E.coli por medio de ultrasonidos o procedimientos mecánicos. Centrifugar a baja velocidad para eliminar las células no destruidas. Recoger el sobrenadante y centrifugarle de nuevo a unos 30000 x g. Los sedimentos contendrán materiales ricos en elementos de la pared y algunas partículas de membrana. Una última centrifugación del sobrenadante de 30.000xg a 160.000 xg proporcionará un sedimento de pequeñas partículas de membrana contaminadas con material de pared y ribosoma, dependiendo del tiempo de centrifugación. Si se desea tener más pura la fracción de membrana se puede filtrar en columna de agarosa Bio-Gel A-150 (112). Con ello se eliminan los ribosomas, las enzimas solubles que haya y quizás algunos contaminantes de pared.

Lederberg (113) comprobó que las bacterias gram negativas podían crecer, sintetizar enzimas y efectuar otras reacciones de biosíntesis cuando se cultivaban en presencia de penicilina si al mismo tiempo se mantenía el medio en condiciones hipertónicas con sacarosa.

El medio de cultivo también requería cantidades variables de Mg^{2+} . Las bacterias cultivadas en estas condiciones carecen de pared. La membrana externa se destruye en presencia de EDTA y su separación de la interna se lleva a cabo por centrifugación diferencial. Este método aparte de los inconvenientes que puedan derivarse de la presencia de la penicilina, tiene un rendimiento muy bajo ya que solo es posible utilizar cultivo en fase logarítmica temprana o media (114).

El método más corriente y también el que permite una obtención de membranas con menor grado de contaminación, está basado en la acción conjunta de la lisozima y el EDTA. La actividad quelante del EDTA para algunos cationes divalentes como el Mg^{2+} origina el desmoronamiento de la membrana externa. Este efecto permite a su vez una mejor acción de la lisozima sobre el peptidoglicano, todo lo cual determinó la fragmentación de las capas externas de la envoltura bacteriana. Las concentraciones de EDTA y lisozima son variables en dependencia de la sensibilidad del microorganismo, incluso dentro de la misma especie. A este proceso sigue la lisis osmótica o mecánica, normalmente en presencia de DNasa. Esta enzima se añade con la finalidad de favorecer la rotura celular ya que el DNA se encuentra de ordinario adherido a la membrana plasmática. Centrifugaciones a distintas velocidades nos permiten obtener la fracción de membrana relativamente no contaminada. Esta técnica ha sido muy empleada y revisada por Kaback (114, 115, 116) y constituye el método normal de trabajo en la obtención de vesículas de membrana (117, 118). El resultado es la

obtención de vesículas de membrana, que forman estructuras cerradas, osmóticamente sensibles y capaces de actuar en sistemas de transporte (116). Su contaminación con restos de otras capas no es demasiado grande, ni tampoco la de enzimas citoplásmicas. En conjunto presentan un 60-70% de proteína, un 30-40% de fosfolípidos y un 1% de hidratos de carbono, expresados en peso seco (116).

Una ventajosa innovación en esta técnica ha sido introducida por Sekizawa y col. (64) consistente en separar por centrifugación los esferoplastos formados con lisozima-EDTA, de los fragmentos de pared antes de la lisis osmótica. Las membranas obtenidas después de la lisis fueron purificadas por gradiente de sacarosa.

Aplicaciones de esta técnica fueron hechas por otros autores como ya queda indicado (56, 61, 62) y los resultados no ofrecen diferencias de consideración a la hora de analizar las fracciones purificadas.

Por último queremos comentar ligeramente los medios utilizados para obtener, con ciertas garantías de pureza, los mesosomas bacterianos. Las técnicas más comunes han sido revisadas recientemente por Reusch y col. (104) y ellas constituyen la base de esta información. El procedimiento comprende dos pasos diferentes y sucesivos. Las bacterias se ponen en un medio hipertónico de sacarosa y concentraciones apropiadas de Mg^{2+} . Con ello se produce la plasmolisis dejando los mesosomas al exterior de la membrana plasmática y en contacto con ella.

La digestión subsecuente de la pared con lisozima libera los mesosomas al medio, al mismo tiempo que produce protoplastos. Las condiciones deben ser siempre hipertónicas y las concentraciones de Mg^{2+} minuciosamente fijadas para que permitiendo la máxima solubilización de los mesosomas, no perjudiquen la estabilidad de los esferoplastos. El segundo paso consiste en la purificación de los mesosomas. Se han utilizado gradientes discontinuos de sacarosa (119) y gradientes continuos de sacarosa y ClCs (120). Sin embargo últimamente han aparecido dos trabajos que purifican los mesosomas de forma más sencilla y con muy buenos resultados (96, 102). En líneas generales pueden resumirse en los siguientes puntos: a) Producción rápida de protoplastos a concentración de sacarosa no excesivamente alta para que la lisozima actúe sin dificultad. b) Concentraciones de Mg^{2+} bien establecidas. c) Manejo suave de los esferoplastos para no alterar su estabilidad. d) Precipitación de los esferoplastos a baja velocidad hasta que haya seguridad de que no quedan residuales. e) Centrifugación del sobrenadante a alta velocidad para sedimentar los mesosomas seguida de repetidos lavados. Este método ha sido empleado en Bacillus subtilis (102) y Micrococcus lysodeikticus (96) pero es aplicable a cualquier microorganismo siempre que se elijan adecuadamente las condiciones de trabajo.

A la vista de los medios que hay que manejar para lograr una fracción mesosomal ausente de contaminaciones, podemos deducir que los métodos normalmente empleados en la obtención de membranas plasmáticas de gram negativas, proporcionan fracciones de membrana

libres de mesosomas. Todos los sistemas de membranas internas han sido expulsados de la bacteria plasmolizada y se han solubilizado con la digestión de la pared. En consecuencia, el sedimento de los esferoplastos lisados deben estar contaminados de mesosomas en una proporción insignificante.

Hemos comenzado esta breve revisión trazando un bosquejo de las vicisitudes por que atravesó el concepto de membrana biológica, hasta plasmarse en el entramado actual de consideraciones y experiencias que constituyen el modelo de membrana.

Toda bacteria gram negativa posee una membrana plasmática cuya arquitectura encaja dentro de modelo general. Una de esas membranas bacterianas, al menos parcialmente, constituye el objeto de nuestro estudio. Por tal motivo, queremos terminar esta rápida exposición, considerando algunos aspectos de la membrana plasmática de las bacterias gram negativas.

Aceptando el término solubilización como sinónimo de dispersión o disgregación, más que como auténtica disolución molecular, hemos visto que la membrana interna de las bacterias gram negativas se puede solubilizar, casi en su totalidad, con N,N'-dimetil formamida (57), con SDS (62, 64) y con Triton X-100 (121). Estos procedimientos destruyen la estructura de la membrana, disgregando sus inte

grantes e inactivan las proteínas funcionales. Son útiles para cuantificar los componentes, pero no nos dan indicaciones precisas acerca de la estructura nativa de una proteína en la membrana y mucho menos de su actividad biológica.

Cuando se quiere conocer cómo es una proteína de membrana en su integridad y cómo funciona, se requieren métodos de solubilización más suaves y dentro de lo posible selectivos. Estas dos condiciones nos permitirán disponer de una proteína en su estado nativo o al menos poco alterado, y al mismo tiempo nos ofrecerán las circunstancias óptimas para una fácil purificación.

Las interacciones responsables del estado estacionario que representa la membrana natural, son de ordinario interacciones débiles. Esto implica el que en determinadas circunstancias se produzca una alteración del estado estacionario motivada por la presencia de un solvente. En este caso, las interacciones solvente-componente de membrana son prevalentes frente a la interacción del componente con la membrana y el componente pasa al solvente. Las proteínas no deben unirse a la membrana de que forman parte al azar, sino que cada una debe tener su sitio específico y sus enlaces específicos. La solubilización selectiva requiere descubrir la naturaleza de esos enlaces y proporcionar las condiciones termodinámicas que determinen su debilitamiento y rotura con un mínimo de daño para la proteína. Tales condiciones vienen de ordinario proporcionadas por alteraciones iónicas del entorno. Cambios en la fuerza iónica afectarán de forma distinta a proteínas unidas prefe-

rentemente a través de interacciones hidrofóbicas o enlaces electrostáticos. La remoción de cationes divalentes con quelantes, favorecerá la liberación de proteínas ligadas mediante puentes metálicos. Cambios de pH, presencia de agentes caotrópicos, privación de distintos tipos de iones son otras constantes que oportunamente manejadas pueden conducir a una solubilización selectiva (122).

No todas las proteínas de membrana son susceptibles de presentar una solubilidad selectiva. Algunas ya han sido solubilizadas de esta forma, y otras podrán serlo si se buscan las condiciones que energéticamente favorezcan su erradicación de la membrana.

La membrana plasmática constituye una unidad estructural; representa la frontera de separación entre el citoplasma celular y el ambiente exterior. Pero no es una entidad estática, inerte, al margen de los procesos biológicos que ocurren en la célula. La membrana plasmática está implicada en la mayoría de los fenómenos que tienen lugar, no solo a través de la misma membrana sino también en el interior del citoplasma. Su importancia funcional ha ido adquiriendo auge a medida que se ha descubierto su participación en las funciones biológicas más importantes del metabolismo celular. Por consiguiente la estructura de la membrana debe ser tal que responda adecuadamente de sus exigencias funcionales.

Los conocimientos actuales sobre la multiplicidad funcional de la membrana nos permiten suponer que ciertas funciones están localmente restringidas, incluso limitadas a una sola proteína como la de unión del DNA a la membrana bacteriana. Otras funciones están encomendadas a áreas más amplias de componentes de membrana como el sistema de transporte de electrones. Por último algunos efectos observados en la célula como respuesta a una gran variedad de estímulos parecen implicar directa o indirectamente toda la membrana celular.

Fenómenos de excitabilidad, respuesta a drogas, hormonas y otros agentes parecen exigir una participación cooperativa de toda la membrana, mientras que otros procesos requerirían sólo una cooperación parcial.

Sin que de momento precisemos más el concepto, admitimos como fenómeno cooperativo aquel efecto que se inicia en un sitio de la membrana y se transmite a otro alejado, por mediación de algún cambio de la estructura intermedia. Puede comprender cambios cooperativos localizados en una determinada región de la membrana y que transmiten efectos de una superficie a la otra, o bien representar cambios cooperativos que impliquen toda la membrana o notables zonas de la misma. La presencia de estímulos eléctricos, luminosos o químicos en un solo sitio o en pocos sitios de la membrana, puede determinar la aparición de efectos generalizados que se manifiestan como una respuesta graduada o bien como una respuesta de todo o nada.

Cuando se altera el potencial de membrana de una célula excitable, el cambio de potencial desencadena efectos cooperativos (123) que se reflejan en un cambio de permeabilidad para determinados iones a lo largo de toda la membrana celular. Esto requiere la mediación de estructuras intermedias que transmitan el efecto de permeación desde el sitio estimulado a puntos alejados de la misma membrana.

Un cuanto de luz absorbido por la rodopsina es suficiente para desencadenar un impulso nervioso (124), lo que supone que una sola molécula de rodopsina alterada por un solo fotón es capaz de iniciar una perturbación de la membrana del segmento externo del bastón que puede propagarse hasta la membrana de la célula sensorial y originar el impulso nervioso.

El transporte mitocondrial de electrones ocasiona un cambio de configuración en las crestas que debe ser el reflejo de cambios conformacionales de las estructuras que toman parte en el proceso energético (125). Tales cambios obedecen a efectos cooperativos localizados en las crestas de la mitocondria.

La membrana de células nerviosas altera notablemente sus propiedades para la permeación de iones, cuando soporta la fijación de moléculas de acetil-colina. Una concentración extremadamente baja de este agente desencadena efectos de permeación detectables a lo largo de toda la membrana celular (126).

La interacción de la hormona humana del crecimiento con membranas de eritrocito ofrece resultados importantes. Setenta moléculas de hormona por eritrocito son suficientes para causar un cambio de fluorescencia de los residuos del triptófano de tal magnitud que debe implicar todas las proteínas de la membrana (127). Esta alteración no es producida por hormonas de crecimiento de otras especies. La transmisión del efecto producido por la hormona, desde los sitios de acción a otros puntos distantes, viene exigida por el reducido número de moléculas hormonales y postula la existencia de estructuras mediadoras.

El mecanismo de acción de las colicinas presenta un óptimo ejemplo de cooperatividad (128). Cada una tiene una acción inhibidora específica, pero por encima de esta especificidad todas tienen algo común, que es la reversibilidad de su acción bioquímica o mortal cuando son tratadas con tripsina. Tal efecto sugiere que las colicinas permanecen unidas a la membrana bacteriana y su primera acción se desarrolla en la propia membrana. El mecanismo propuesto por Nomura (128) supone que la partícula de colicina se une al sitio receptor causando un cambio reversible del mismo, pero no necesariamente un efecto directo sobre alguna estructura celular que quede bioquímicamente alterada o incluso determine la muerte de la célula. El cambio producido en el receptor es transmitido a través de la membrana hasta un componente celular que constituye el blanco de la acción de la colicina.

La alteración de este componente puede expresarse en forma de cambios bioquímicos que en ocasiones conducen a la muerte de la bacteria. La inmunidad colicinogénica es debida a una alteración en el mecanismo de iniciación o de transmisión del estímulo específico, que afecta al blanco en la célula sensible.

Estudios más recientes con colicina E1 han confirmado que este mecanismo puede dar cuenta del proceso real por el que actúan las colicinas. La interacción de la colicina E1 en células sensibles de E.coli produce un incremento del 100% en la fluorescencia del 8-anilino-1-naftaleno sulfonato (ANS) unido a la membrana, y este cambio aparece como un fenómeno de todo o nada, en función de la multiplicidad de la colicina E1 (129). El incremento de fluorescencia del ANS unido a la célula, implica que la colicina E1 aumenta la permeabilidad de la membrana al ANS o facilita los sitios de fijación, o también que los sitios de fijación para el ANS se vuelven más hidrofóbicos en presencia de la colicina E1. En cualquier caso el incremento de fluorescencia inducido por la colicina es una medida de los cambios estructurales o conformacionales que ocurren en la membrana.

Todos los casos que acabamos de enumerar, algunos tan frecuentes como los que ocurren en las células excitables, están dominados por un modo de acción aparentemente común y radicado en la membrana celular. Un estímulo de muy variada naturaleza produce un efecto sobre un receptor a veces altamente específico. Este efecto es transmitido

transversal o tagencialmente a través de estructuras mediadoras hasta otros puntos de la membrana, donde tiene lugar la aparición de una nueva propiedad funcional que puede afectar a la misma membrana o componentes citoplásmicos. La acción de esta nueva propiedad se manifiesta como una respuesta al estímulo aplicado; unas veces generalizada, rápida y en apariencia desproporcionada a la concentración de ligando (estímulo), constituyendo la respuesta de todo o nada, otras localizada o también general pero guardando una gradación en función de la intensidad del estímulo o concentración de ligando; respuesta graduada.

Teniendo en cuenta este comportamiento, el concepto de membrana biológica guarda una estrecha relación con el concepto de enzima reguladora. Una enzima reguladora controla su actividad enzimática mediante ligandos específicos a través de interacciones indirectas entre sitios topológicamente distintos. Tales efectos indirectos o alostéricos vienen mediados por la molécula enzimática que experimenta cambios conformacionales (47). La unión de un ligando a una enzima reguladora induce o estabiliza la transición alostérica que ha ocurrido como efecto de las interacciones entre distintos sitios de fijación.

La idea de que cambios conformacionales o transiciones alostéricas efectuadas por proteínas sean los mediadores de efectos indirectos o alostéricos, no es exclusiva de enzimas reguladoras. El concepto de interacciones alostéricas intramacromoleculares ha sido ampliado a estruc-

turas más complejas como la membrana biológica (130). La ampliación parece lógica si tenemos en cuenta que tanto la membrana como la enzima reguladora controlan su actividad biológica mediante ligandos reguladores específicos que no toman parte en los enlaces covalentes, pero - que interaccionan reversiblemente con receptores reguladores de la superficie de ciertos componentes del complejo. Estos ligandos específicos unidos a la enzima controlan sus propiedades catalíticas o de fijación, mientras que su unión a la membrana controla la permeación de la misma a distintos tipos de iones, la inhibición de determinados procesos biosintéticos y otros muchos procesos, como queda indicado anteriormente. Otro notable punto de coincidencia entre membranas y enzimas reguladoras es que la respuesta a concentraciones crecientes de ligando no es lineal. Ambas estructuras manifiestan fenómenos cooperativos complejos que implican la necesidad de niveles umbrales de ligandos reguladores para detectar actividad biológica. En consecuencia tanto la membrana como la enzima reguladora están dotadas de sitios reguladores con estereoespecificidad para determinados ligandos y presentan la propiedad de experimentar cambios conformacionales reversibles en las estructuras receptoras de ligandos, capaces de transmitirse a otras estructuras alejadas del sitio de fijación.

A pesar de las semejanzas funcionales y reguladoras entre membrana y enzima alostérica, existen notables diferencias entre estas dos entidades cuando se trata de aplicar a ambas de modo indiscrimina-

do el modelo alostérico de Monod y col. (47). Según este modelo las enzimas reguladoras son oligómeros integrados por protómeros idénticos, asociados de tal modo que ocupan siempre posiciones equivalentes. Cada protómero puede tener, al menos, dos estados conformacionales, pero no independientemente de los demás protómeros del oligómero. El cambio de conformación de un protómero implica el que todos los protómeros del oligómero experimenten el mismo cambio, de tal manera que la proteína mantenga inalteradas sus propiedades de simetría.

La extrapolación de estas ideas al concepto de membrana tal como hoy la conocemos no es una tarea factible. Toda la membrana representaría un macrooligómero cuyos protómeros estarían formados por unidades protéicas de la membrana. Ahora bien, la caracterización de estas unidades es todavía problemática. De acuerdo al modelo de Singer (35) serían lipoproteínas integrales distribuidas a lo largo de la membrana sin más exigencias de regularidad y simetría. Según Green y col. (36) los protómeros estarían formados por los complejos de proteínas con sus lípidos asociados. Este modelo encaja mejor con los postulados de la teoría alostérica aunque sin dar razón de todas sus exigencias. Las propiedades de simetría no se encuentran en la membrana antes ni después de los cambios de conformación experimentados por sus estructuras elementales. Por consiguiente la ampliación del concepto de enzima reguladora a la membrana debe hacerse teniendo presente las restricciones impuestas por la misma estructura de la membra

na, entre las que podemos citar la falta de propiedades de simetría, el desconocimiento del concepto de protómero y la transición alostérica de cada protómero impuesta por su relación con los restantes protómeros. De hecho se admite que al lado de un protómero que haya sufrido una transición pueden existir otros que no hayan experimentado ningún cambio.

Las enzimas alostéricas presentan sitios estereoespecíficos para la fijación de metabolitos reguladores. Las membranas también. Pero la complejidad de ligandos que se fijan a la membrana es un exponente de su compleja estructura y de sus múltiples funciones. Podemos clasificarlas en cuatro grupos de acuerdo con Wallach (131) atendiendo a sus pesos moleculares.

El primer grupo comprende a los efectores más simples, cuyo peso molecular es inferior a 50 daltones. Entre otros podemos citar los iones H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} y Cl . Sus sitios de fijación deben estar caracterizados por la carga y el tamaño del ión, no siendo exclusivos de lípidos o proteínas.

El segundo grupo comprende sustancias de pesos moleculares que pueden variar entre 50 y 1000. Los fosfolípidos, esteroides, antibióticos, aminoácidos, transmisores sinápticos, azúcares, etc. pertenecen a esta categoría. Los receptores de estos ligandos deben ser altamente específicos y dotados de grupos de fijación con una determinada orientación en el espacio. Los mejor conocidos son

de naturaleza proteica y se supone que están capacitados para efectuar cambios conformacionales en presencia del ligando.

El tercer grupo está integrado por macromoléculas de pesos moleculares muy variados. Podemos citar entre otras, enzimas, anticuerpos, proteínas hormonales, antígenos, lectinas, colicinas, etc. Estos ligandos requieren receptores complejos en su organización, pertenecientes a componentes macromoleculares de la membrana.

El cuarto grupo está formado por sistemas biológicos de elevada complejidad como pueden ser los virus, los polisomas y otras células.

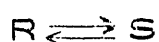
El tipo de relación existente entre estos diferentes ligandos viene definido por sus posibles interacciones (132). Habrá interacciones directas entre dos ligandos cuando ambos ocupen el mismo sitio debido a su semejanza estructural o cuando la proximidad de los sitios permita que mutuamente se interaccionen. En el primer caso se trata de impedimento estérico que implica competitividad y en el segundo simplemente de interacciones directas entre ligandos. Habrá interacciones indirectas o alostéricas cuando los sitios de fijación de los ligandos sean topológicamente diferentes, de tal manera que la relación de un ligando con el otro venga mediada por una proteína o bien por una estructura de membrana de mayor complejidad.

Las interacciones directas entre ligandos de membrana son probables cuando se trata de ligandos comprendidos en el mismo gru

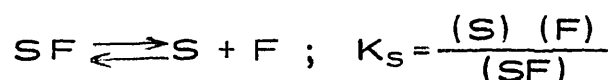
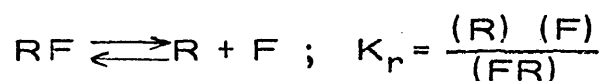
po, pero parece difícil que sustancias reguladoras de muy diversos tamaños moleculares y composición se interaccionen directamente. Como ejemplo claro de interacción indirecta podemos citar la inhibición irreversible de la actividad colinérgica de la acetilcolina por el TDF (133). Análogos de la acetilcolina como la carbamilcolina se unen al sitio de la acetilcolina despolarizando la membrana en tanto que el TDF se une sin causar despolarización. Esto indica que el sitio de la acetilcolina es topológicamente distinto de los sitios implicados en mantener el potencial de membrana y su despolarización.

El tratamiento teórico del fenómeno cooperativo en membranas ha sido desarrollado en varios trabajos, por Changeux y col. (130, 134, 135) y Hill (123). Admitimos que un protómero de membrana está representado por una proteína integral capaz de existir en dos estados conformacionales reversibles distintos, con diferentes afinidades por el ligando. Estos protómeros están dotados de sitios receptores para sus ligandos específicos. El estado conformacional depende de la asociación de cada protómero con los protómeros más próximos, de tal forma que el protómero está determinado en su conformación por la organización estructural de la membrana.

Suponemos que un protómero puede presentarse en dos estados conformacionales R y S relacionados por el equilibrio:



Cuando cada protómero dispone de un solo sitio receptor para el ligando F las constantes de disociación pueden expresarse de la siguiente forma:



El comportamiento de este sistema puede describirse mediante dos funciones independientes:

$\langle r \rangle$ función de estado que representa la fracción de protómeros en estado R

$\langle y \rangle$ función de fijación correspondiente a la fracción de sitios actualmente ocupados por el ligando.

Sea ϵ la energía necesaria para pasar un protómero del estado S al R cuando todos los demás protómeros se encuentran en el estado S, y ϵ' la energía requerida cuando solo algunos protómeros permanecen en el estado S. La energía ϵ' es una función lineal de la fracción $\langle r \rangle$ de protómeros que han experimentado la transición de S a R, pudiendo escribir:

$$\epsilon' = \epsilon - \eta \langle r \rangle$$

donde η representa la energía de interacción entre los protómeros más próximos y el término $\eta \langle r \rangle$ la interacción media con todos los protómeros al estado R.

La constante de isomerización $I = \frac{\langle s \rangle}{\langle r \rangle}$, cuando solo un

protómero sufre la transición, se puede expresar como:

$$I = e^{\frac{N}{RT} \cdot \varepsilon}$$

mientras que si únicamente algunos protómeros permanecen al estado S, toma la forma,

$$I' = \frac{\langle s \rangle}{\langle r \rangle} \quad \text{que se puede expresar en los términos}$$

siguientes:

$$I' = e^{\frac{N}{RT} \cdot \varepsilon} \cdot e^{-\frac{N}{RT} \cdot \eta} \quad (\eta < \varepsilon)$$

Es decir, I es la constante de isomerización de un protómero en un medio de protómeros en la forma S. mientras que I' viene determinado por la presencia de otros protómeros R próximos al que sufre el cambio conformacional.

En estas expresiones $\langle s \rangle$ es una función de estado que representa la fracción de protómeros en estado S, N es el número de Avogadro, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. La expresión $e^{-\frac{N}{RT} \cdot \eta}$ suele representar por el símbolo Λ debido a su gran importancia en este sistema, ya que indica la cooperatividad del mismo sistema. Cuando su valor es la unidad no existe cooperatividad alguna, mientras que cuanto más pequeña se haga mayor interacción positiva debe existir entre los protómeros.

Según esto la constante de isomerización I' puede escribirse $I' = I \Lambda^n$.

Teniendo en cuenta que sólo existe un sitio receptor para el ligando F por protómero, el total de protómeros puede expresarse

de la siguiente manera:

$\langle r_0 \rangle$ fracción de protómeros en estado R sin ligando unido

$\langle r_1 \rangle$ fracción de protómeros en estado R con ligando unido

$\langle S_0 \rangle$ fracción en estado S sin ligando unido

$\langle S_1 \rangle$ fracción en estado S con ligando unido

Según esta distribución la función de estado es:

$$\langle r \rangle = \frac{\langle r_0 \rangle + \langle r_1 \rangle}{\langle r_0 \rangle + \langle r_1 \rangle + \langle S_0 \rangle + \langle S_1 \rangle} = \frac{1 + \alpha}{1 + \alpha + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} (1 + \alpha c)}$$

y la función de fijación del ligando F,

$$\langle y \rangle = \frac{\langle r_1 \rangle + \langle S_1 \rangle}{\langle r_0 \rangle + \langle r_1 \rangle + \langle S_0 \rangle + \langle S_1 \rangle} = \frac{\alpha (1 + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} c)}{1 + \alpha + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} (1 + \alpha c)}$$

En estas expresiones α es la concentración relativa de ligando F/K_R

y c el coeficiente de fijación no exclusiva K_R/K_S

Ecuaciones más generales pueden ser deducidas para el caso de dos ligandos unidos a un mismo protómero (134).

Los dos ligandos F_1 , F_2 pueden unirse al mismo receptor dando lugar a interacciones isostéricas cuyas funciones de estado y fijación son las siguientes:

$$\langle r \rangle = \frac{1 + \alpha_1 + \alpha_2}{(1 + \alpha_1 + \alpha_2) + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} (1 + \alpha_1 c_1 + \alpha_2 c_2)}$$

$$\langle y \rangle = \frac{\alpha_1 (1 + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} c_1)}{(1 + \alpha_1 + \alpha_2) + 1/\Lambda^{\langle r \rangle} (1 + \alpha_1 c_1 + \alpha_2 c_2)}$$

Si F_1 y F_2 se unen a sitios distintos dando lugar a inter-

acciones alostéricas, las funciones de estado y fijación se pueden escribir:

$$\langle r \rangle = \frac{(1 + \alpha_1) (1 + \alpha_2)}{(1 + \alpha_1) (1 + \alpha_2) + 1 \wedge \langle r \rangle (1 + \alpha_1 c_1) (1 + \alpha_2 c_2)}$$

$$\langle y \rangle = \frac{\alpha_1 (1 + \alpha_2) + \alpha_1 1 \wedge \langle r \rangle (1 + \alpha_2 c_2) c_1}{(1 + \alpha_1) (1 + \alpha_2) + 1 \wedge \langle r \rangle (1 + \alpha_1 c_1) (1 + \alpha_2 c_2)}$$

La cinética de saturación de un ligando da lugar en enzimas reguladoras a curvas sigmoides, cuya sigmoidicidad depende de las interacciones entre los protómeros. La cooperatividad será tanto mayor cuanto más fuertes sean las interacciones, de tal manera que el debilitamiento de éstas se acompaña de pérdida de sigmoidicidad de la curva, llegando a una forma hiperbólica cuando los protómeros no se interaccionan en absoluto.

En las membranas biológicas nos encontramos con curvas de respuesta a concentraciones crecientes de ligando de forma más o menos sigmoide, y otras extremadamente puntiagudas. Las primeras reciben el nombre de respuestas graduadas y las segundas se denominan de todo o nada.

De acuerdo con el modelo expuesto, una respuesta graduada debería reflejar una interacción débil entre los protómeros de la membrana. Una respuesta de todo o nada debería ocurrir cuando los protómeros se interaccionasen fuertemente.

A la vista de los parámetros introducidos en el modelo podemos discutir el carácter cooperativo de estas respuestas. Cuando el parámetro de cooperatividad Λ vale la unidad, los protómeros son independientes y las curvas de $\langle r \rangle$ y $\langle y \rangle$ hipérbolas.

El decrecimiento de Λ se traduce en curvas de $\langle r \rangle$ y de $\langle y \rangle$ dotadas de cooperatividad tanto mayor cuanto menor sea el valor de Λ , lo que indica una respuesta graduada. Es de notar que la curva de $\langle r \rangle$ no pasa por cero cuando la concentración de ligando vale cero. Esta consecuencia viene impuesta por la suposición de que el equilibrio entre R y S existe aun en ausencia de ligando unido, lo que marca una notable diferencia entre este modelo y el del acoplamiento inducido (136).

Existe un valor crítico de Λ para el cual las curvas de saturación se hacen discontinuas, y que da razón de la respuesta de todo o nada. Para este valor $\Lambda_c = e^{-4} = 0.01831$ y $N_{\eta_c} = 4RT$. El sistema se vuelve altamente cooperativo y metastable. Un pequeño cambio en la concentración de ligando y la unión de pocas moléculas del mismo producen una extraordinaria perturbación en toda la membrana con múltiples alteraciones de sus funciones. Este fenómeno se interpreta como una transición de fase entre dos estados estables de la membrana correspondientes a los dos estados conformacionales de los protómeros (130).

La naturaleza nos brinda ejemplos de este comportamiento

en los órganos olfatorios de ciertos insectos, la muerte bacteriana por moléculas de colicina, la hemólisis de eritrocitos por una simple molécula de complemento anticuerpo, y otros muchos.

En el modelo del acoplamiento inducido (136) existe una relación directa entre la cantidad de ligando que se une o libera de la membrana y el número de protómeros que sufren la transición alostérica. Sin embargo en el modelo que presentamos no ocurre esto. Las funciones de estado y de fijación no coinciden necesariamente. La unión de un reducido número de moléculas de ligando puede corresponderse con amplios cambios de conformación en la membrana, y por el contrario pequeños cambios en la membrana pueden ir acompañados por fijación o liberación de un notable número de moléculas de ligando.

Esta propiedad amplificadora ha sido resaltada por Changeux y col. (134) quienes introdujeron un coeficiente de amplificación para caracterizarla:

$$a(\alpha) = \frac{1}{\langle r \rangle_{\max} - \langle r \rangle_{\min}} \cdot \frac{\delta \langle r \rangle}{\delta \langle y \rangle}$$

El coeficiente es función de la concentración relativa de ligando para unos valores determinados de los demás parámetros, existiendo un valor de α para el cual el coeficiente es máximo. Entonces la fracción de protómeros que experimenta la transición es tres veces mayor que la fracción de sitios ocupados. Para otros valores de α el coeficiente es menor que la unidad, lo que indica que la fracción

de protómeros que experimentan la transición es menor que la fracción de sitios ocupados.

Por último ciertos valores de los parámetros hacen la amplificación infinita. Cuando $c = 0$, $\Lambda \leq e^{-4}$, $1 = \Lambda^{-\frac{1}{2}}$ y $\alpha \rightarrow 0$.

Es la respuesta de todo o nada en que pequeñísimas concentraciones de ligando producen una perturbación total en los protómeros de la membrana. La diferencia entre el número de protómeros que han cambiado de conformación y el de sitios ocupados es prácticamente de todo a nada.

La acción de los activadores e inhibidores también encuentra su explicación en este modelo. Los activadores tendrían mayor afinidad por la forma R y consiguientemente estabilizarían el estado activado de la membrana. El coeficiente de fijación no exclusiva sería menor que la unidad. Por el contrario los inhibidores se unirían a la forma S, estabilizando el estado inactivo de la membrana, y el coeficiente de fijación no exclusiva sería mayor que la unidad. El efecto antagónico de estos compuestos vendría mediado por las transiciones alostéricas del protómero entre dos estados conformacionales extremos.

El valor del coeficiente C que se ve afectado por la acción de activadores e inhibidores representa un dato de gran importancia. Parece normal que la función de estado tendiera a la unidad cuando la concentración de ligando se incrementa indefinidamente, sin embargo no es así. La función de estado $\langle r \rangle$ tiende a un límite entre 0 y 1

impuesto por el coeficiente C . Sólo cuando C vale cero la función de estado tiende a la unidad.

De todo esto se deduce que el paralelismo establecido entre enzimas reguladoras y membranas biológicas es válido. La actividad de unas y otras puede ajustarse a modelos idénticos teniendo en cuenta la natural diferencia de complejidad. Las funciones desarrolladas por la membrana son múltiples en su naturaleza y variadas en su magnitud. Pero en todo caso, ya impliquen la totalidad de la membrana ya estén limitadas a áreas de distinta amplitud, su comportamiento frente a variaciones en la concentración de ligando se adecua perfectamente al modelo teórico que siguen las enzimas alostéricas.

Por otra parte la variedad de respuestas que encontramos en la membrana, algunas extremadamente rápidas, otras graduadas, encuentran su explicación en la variabilidad de los parámetros que se manejan en el modelo. En conclusión, el modelo da cuenta de la actividad biológica que puede desarrollar una membrana plasmática, aun admitiendo la diversidad de criterios a la hora de expresar su estructura.

El conocimiento de una membrana bacteriana puede abordarse desde distintos puntos de vista. Nuestro trabajo tenía un objetivo bien concreto: estudiar las relaciones que existen entre ciertas enzi-

mas asociadas a la membrana y la propia membrana. Con ello intentá-
bamos descubrir las implicaciones estructurales y funcionales a que -
está sometido un componente biológicamente activo por el hecho de ha-
llarse asociado a la membrana celular. Las enzimas seleccionadas pa-
ra este trabajo fueron la ATPasa y la NADH deshidrogenasa de E.
coli aun cuando nuestros resultados fueron obtenidos fundamentalmente
con la primera. Los pasos seguidos en este estudio pueden reducirse
a los siguientes puntos:

- 1º - Solubilización selectiva de las enzimas citadas más arriba. Este
dato permite deducir el tipo preferente de enlace que las mantie-
ne asociadas a la membrana así como la intensidad de esta aso-
ciación. La solubilización de la ATPasa fué llevada a cabo en
dos tipos diferentes de preparación de membrana.
- 2º - Purificación parcial de la ATPasa y determinación de algunos pa-
rámetros moleculares.
- 3º - Estudios sobre la inestabilidad de la fracción soluble de ATPasa.
- 4º - Cinética comparativa de la ATPasa al estado soluble y unida a
la membrana.
- 5º - Estudio detallado del efecto estimulador de la tripsina sobre la
ATPasa, tanto en su forma unida a la membrana como soluble o
parcialmente purificada.

Creemos que nuestros resultados aportan conclusiones inter-

resantes que nos permiten tener un mejor conocimiento de la estructura de la membrana de E.coli, y de alguna de sus propiedades funcionales y actividades reguladoras. Al mismo tiempo nos posibilitan establecer relaciones de comparación con procesos similares estudiados en otros microorganismos e incluso organismos superiores. Todo ello contribuye a comprender mejor la naturaleza de una bacteria gram negativa como E.coli y a establecer con mayor concretez las diferencias que la individualizan dentro del complejo mundo que forman los seres vivos.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de *E.coli*

La cepa de *E.coli* que hemos utilizado en este trabajo tiene el número 414 (Hfr.thr⁻) de la colección del Dr. J. Puig (Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela).

La bacteria fué cultivada en un medio que contenía 5 g de agar nutritivo, 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de carne y 0.3 g de glucosa por litro de cultivo. La siembra se efectuó a partir de un inóculo de 5 ml de células en estado estacionario temprano que habían sido cultivadas en el mismo medio. Cada inóculo se aplicó a 500 ml de cultivo contenidos en matraces de un litro. Estos matraces se mantuvieron en agitación a 37°C durante tres horas y media. Al final de ese periodo, el cultivo se encuentra en fase exponencial avanzada, como se indica en la Fig. 1. En ese momento se detiene el crecimiento recogiendo las bacterias por centrifugación a 4000 x g en una centrífuga Sorvall RC2-B, a 0-4 °C. El microorganismo sedimentado se lava una vez con Tris 10 mM, pH 7.5 antes de iniciar la preparación de membranas. El volumen de tampón utilizado en estos lavados fué de 30 ml por cada 500 ml de cultivo bacteriano.

Preparación de membranas.

Las células de *E.coli* una vez lavadas y sedimentadas por centrifugación fueron sometidas a dos tipos distintos de tratamiento. -

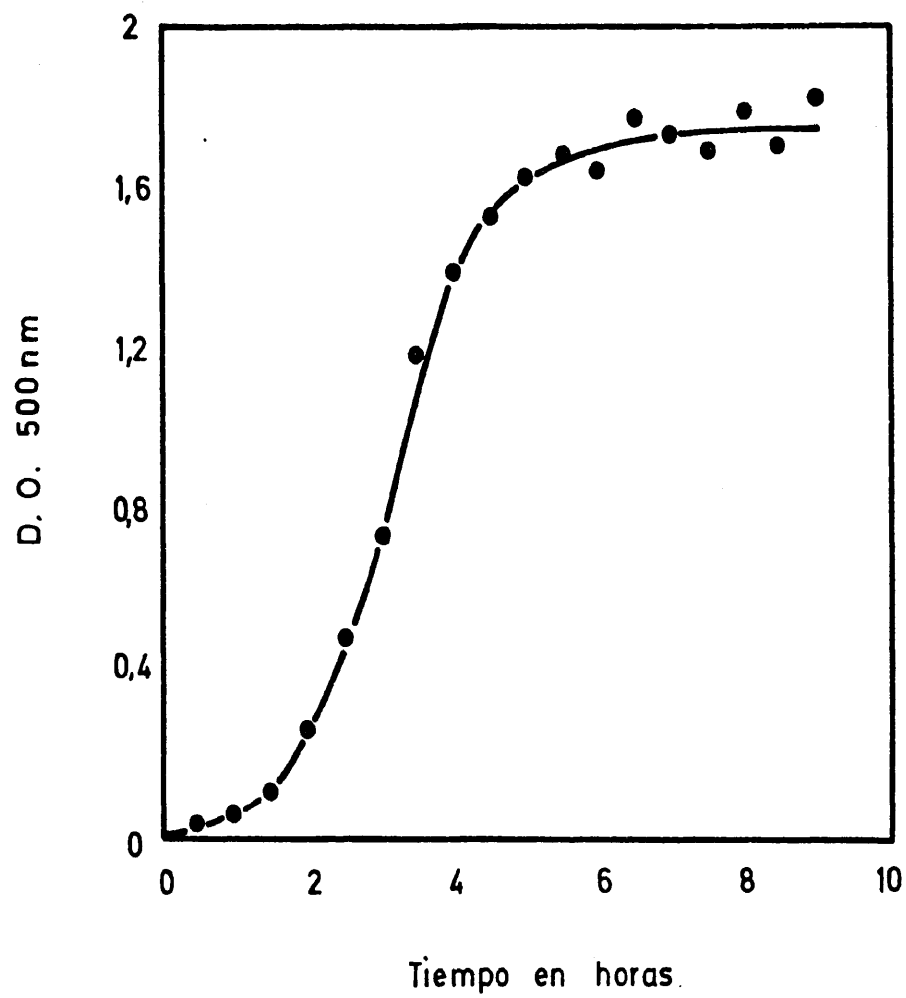


Fig. 1 - Curva de crecimiento de Escherichia coli K-12

En ambos casos obteníamos fracciones enriquecidas en membrana plasmática aunque con distintos grados de integridad. Cuando aplicamos las técnicas corrientes (114, 117) el resultado fué normal. La fracción de membranas contenía pequeñas vesículas contaminadas con fragmentos de membrana externa. Sin embargo, la introducción de una modificación a este método dió resultados morfológicamente bastante diferentes. Las membranas obtenidas por nosotros presentaban un tamaño semejante al de la célula bacteriana, y un aspecto en apariencia poco contaminado con elementos de pared, como se puede ver en la Fig. 2. Indudablemente estos hechos suponen que la estructura de la membrana ha sufrido menos en las manipulaciones de aislamiento, y en consecuencia representa un material más idóneo para cualquier tipo de estudio de membrana como tal, o de sus componentes como entidades integrantes del todo.

El método que nosotros hemos seguido puede resumirse en los siguientes puntos:

12.- Las bacterias lavadas se tratan con EDTA 20 mM en Tris 30 mM, pH 8 y se mantienen durante 30 min. a temperatura ambiente. El resultado es la fragmentación de la membrana externa y su separación parcial del resto de la cubierta celular. El volumen de tampón empleado tanto en este como en los tratamientos siguientes es de 10ml, por cada 500 ml de medio de cultivo. A continuación se centrifuga a



Fig. 2 - Membranas de E. coli vistas al microscopio electrónico.
85.000 aumentos.

4000 x g a 0-4 °C, durante 15 min. El sobrenadante está compuesto por el tampón y parte de la membrana externa fragmentada y separada de la bacteria.

2º.- El sedimento se resuspende en un medio hipertónico de sacarosa al 20%, Tris 30 mM, pH 8 y lisozima a una concentración final de 0,5 mg/ml. La suspensión se mantiene en agitación por espacio de una hora a temperatura ambiente. Estas condiciones son suficientes para que todas las bacterias se conviertan en esferoplastos, los cuales se sedimentan por centrifugación a 13400 x g. El sobrenadante contiene restos de pared digeridos por la lisozima y disociados de la membrana plasmática que se desechan.

3º.- Con el fin de eliminar la lisozima que pudiera quedar adherida a la membrana, así como otros fragmentos de pared o incluso membrana exterior, los esferoplastos sedimentados se resuspenden en tampón fosfato 0,1 M, pH 6.5 y sacarosa al 20%. Una nueva centrifugación 13400 x g permite sedimentar los esferoplastos.

4º.- El sedimento se resuspende en Tris 20 mM pH 7.5 que contiene DNasa a una concentración de 20 µg/ml. Después de 15 min. a temperatura ambiente, la lisis de los esferoplastos es casi total. Una centrifugación a 37.000 x g sedimenta las membranas dejando el contenido citoplásmico en el sobrenadante.

5º.- Las membranas así obtenidas se lavan dos veces con Tris 20 mM pH 7.5 y Cl_2Mg 1 mM, recogiénolas siempre por centrifugación a

37000 x g. La adición de Cl_2Mg 1 mM tiene por objeto mantener en su estado nativo las estructuras membranosas, ya que los repetidos lavados privarían a la membrana de estos cationes que, juegan un importante papel en la estabilidad de las membranas biológicas.

Todas las centrifugaciones realizadas durante la preparación de ambos tipos de membranas se efectuaron en una centrífuga Sorvall RC2-B a 0-4 °C.

Con este tipo de preparación se obtiene un rendimiento de 20 mg de proteína de membrana por cada litro de cultivo bacteriano. Si no se advierte otra cosa, en todas las experiencias realizadas con membranas, se partía de una suspensión que contenía 1 mg de proteína de membrana por ml de suspensión.

Cuando aplicamos las técnicas corrientes de preparación de membranas (114, 117) el rendimiento fué de 10 mg de proteína por litro de cultivo y en las experiencias efectuadas con este tipo de membranas se partía de una concentración de proteína de 0,5 mg/ml. En cualquiera de los casos las membranas se almacenaron en forma de sedimentos a 0 °C.

En adelante las membranas preparadas siguiendo las técnicas en uso hasta el presente, las denominaremos "vesículas" teniendo en cuenta su pequeño tamaño, mientras que las obtenidas de acuerdo con la modificación introducida por nosotros serán llamadas simplemente "membranas" o suspensión de membranas.

Las características diferenciales de las membranas obtenidas por tratamiento secuencial con EDTA y lisozima, y las de las vesículas preparadas por acción simultánea de estos dos agentes, serán comparadas en los apartados dedicados a la solubilización de la ATPasa, en Resultados.

Cuando las membranas se utilizaron en experiencias con NADH-deshidrogenasa fué necesario introducir alguna variación. Los esferoplastos lavados con tampón fosfato, se repartían en fracciones iguales, los cuatro sufrían la lisis osmótica. A cada fracción se le añadía una concentración determinada de Cl_2Mg a excepción de una muestra que se dejaba como control. Las concentraciones de Cl_2Mg empleadas fueron 1, 2, 5, 10, 20 mM. En otras experiencias el magnesio fué sustituido por la espermidina a las concentraciones de 1, 2, 3, 5, 10 mM.

Después de 15 min. a 20 °C prácticamente todos los esferoplastos se habían roto. Una centrifugación a 37.000 x g separaba un sobrenadante que contenía el citoplasma y cantidades variables de NADH -deshidrogenasa según los tratamientos. Este sobrenadante se guardaba para determinación de actividades y proteínas. El sedimento de 37.000 x g estaba formado por las membranas, las cuales se lavaban dos veces como queda indicado, en presencia de las concentraciones de Cl_2Mg o espermidina empleadas en la lisis. Las membranas del segundo lavado fueron utilizadas en los ensayos de actividad NADH -deshidrogenasa y experiencias de solubilización de la misma enzima.

Solubilización de ATPasa

La obtención de ATPasa en forma soluble se llevó a cabo a partir de membranas almacenadas cuyo sedimento y cuyo tiempo de almacenaje nunca fuera superior a una semana. El proceso de solubilización consiste en resuspender las membranas o vesículas en diferentes tampones de extracción a concentraciones de proteína de 1mg/ml ó 0,5 mg/ml según las preparaciones, mantener estas suspensiones a 37°C durante 30 min. y centrifugarlas a 37.000 x g a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de estas centrifugaciones se consideraron como material soluble, mientras que los sedimentos residuales se resuspendieron en sus volúmenes originales, cuando se querían emplear en posteriores ensayos. Por exigencia de las experiencias que se querían realizar, algunas veces, la concentración de proteínas de membranas en el líquido de solubilización era bastante inferior a la concentración original, como se verá en Resultados. Hay que notar que una reducción en el tiempo de incubación de las preparaciones de membrana con los tampones de extracción y una disminución en la temperatura o ambas a la vez, no marcaron diferencias apreciables. Por esta razón, salvo las primeras extracciones, todas las restantes se efectuaron resuspendiendo las membranas en los tampones de extracción y dejándolo 15 min. a temperatura ambiente.

El material soluble y los sedimentos residuales fueron utilizados para estudios de actividad ATPásica y concentración de proteína, y establecer así resultados comparativos con la suspensión origi-

nal de membranas y vesículas.

Ensayo de actividad enzimática

La determinación de la actividad ATPásica se efectuó en un medio que contenía 4 μ moles de ATP, 2 μ moles de Mg^{++} , y 12 μ moles de Tris pH 7.5, en un volumen total de 400 μ l. Variaciones en la concentración de ATP, Mg^{++} o los dos a la vez se expondrán más adelante en Resultados. La reacción se inició añadiendo 100 μ g de proteína de membrana ó 50 μ g de vesículas en 100 μ l de Tris 20 mM (pH 7.5) - Mg^{++} 1 mM.

Las cantidades de proteína soluble, añadidas en el mismo volumen que las anteriores pero en los líquidos de solubilización, fueron más variables. El margen de variación oscila desde 3 μ g a 40 μ g de proteína total soluble. En los ensayos con tripsina, la proteasa fué adicionada antes que la ATPasa a una concentración de 0,2 mg/ml del medio de reacción. A continuación se incubó la muestra completa a 37°C por tiempos variables según los requerimientos de la experiencia. La reacción se detuvo introduciendo los tubos de ensayo en baño de hielo y añadiendo rápidamente los reactivos para determinar el Pi liberado según el método de Racker y Vambutas (137) tal como fué descrito por Muñoz y col. (138).

De acuerdo con este método, terminada la reacción, las muestras se diluyen con 3.2 ml de agua destilada a 0°C. Inmediatamente se añade 1 ml de Molibdato amónico al 2,5% en ácido sulfúrico

5N, y 0,25 ml de ácido amino naftol sulfónico al 0,25% en un medio reductor, compuesto de SO_3Na_2 40 mM y SO_3HNa 0,7 M.

Después de 5 min. a 37°C todo el P_i liberado en la reacción se ha convertido en fosfomolibdato, obteniéndose un color azul intenso con una absorción máxima a 650 nm.

Con el fin de eliminar los posibles errores introducidos por la hidrólisis espontánea del ATP, se hicieron blancos apropiados para cada determinación, que se trataron lo mismo que las restantes muestras.

Cuando los ensayos de actividad se efectuaron con ATP - y ^{32}P , el medio de reacción y la incubación de las muestras se llevaron a cabo de la forma descrita más arriba. La reacción se detuvo añadiendo a cada tubo de ensayo 0,5 ml de carbón activo al 4% en ClK-ClH 0,2M, pH 1.6. Teniendo en cuenta las variaciones en las concentraciones de ATP, fué necesario utilizar en algunos casos, concentraciones mayores de carbón activo para adsorber todo el sustrato presente en el medio de reacción. Las muestras así preparadas se agitaron y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min. en una centrifuga Sorvall RC2-B. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se contaron en un contador de centelleo de Nuclear Chicago. En estudios de cinética de saturación de sustrato se hicieron controles para todas las muestras con distinta concentración de ATP. Su objeto era corregir la hidrólisis espontánea de sustrato y la posible incapacidad del carbón activo para adsorber todo el ATP no hidrolizado.

Se ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de P_i en 30 min. y la actividad específica como el número de unidades por mg. de proteína. En estudios de cinética definiremos la unidad de actividad específica como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de P_i por min. y por mg. de proteína.

La cantidad de proteína fué determinada por el método de Lowry y col. (139) con seroalbúmina bovina como standard.

Inhibición por ADP y P_i

Los estudios de inhibición por ADP y P_i fueron efectuados determinando su efecto sobre velocidades iniciales de reacción. Las velocidades fueron obtenidas bajo condiciones normales de ensayo de ATPasa pero con algunas variaciones. Cuando se estudiaban curvas de saturación de sustrato a distintas concentraciones de ADP o P_i , estos inhibidores se añadían al medio de reacción en tampón de Tris-HCl 30 mM, pH 7.5. La reacción se iniciaba por la adición de la enzima e incubación a 37°C. Las demás condiciones se mantenían inalterables. Las concentraciones de ADP empleadas en experiencias de inhibición fueron 0.4, 1.2, y 2.4 mM; y las de P_i 2 y 4 mM. En experiencias de variación de velocidades iniciales frente a concentraciones crecientes del inhibidor, a cantidades fijas de sustrato, el rango de concentraciones de ADP varió de 0.02 mM hasta 5 mM. El inhibidor fué añadido a Tris 30 mM, pH 7.5. De modo semejante se

operó con el Mg^{2+} cuando se estudió la saturación a magnesio a concentración constante de ATP.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis analítica de las preparaciones solubles se efectuó en geles de 0,6 cm. de diámetro por 4 ó 12 cm de longitud, al 7% de acrilamida y al 0,183% de N,N'-metilenbisacrilamida. Como tampón se ha utilizado Tris 5 mM - Glicocola 37,5 mM, pH 8.5 ± 0.2 . Las muestras se corrieron a 2 mA y 5 mA por gel, el tiempo necesario para que el marcador (azul de bromofenol) llegara aproximadamente a 1 cm del final del gel. Las proteínas fueron teñidas de acuerdo al método de Fairbanks y col. (140).

Para la tinción enzimática de la ATPasa los geles se corrieron en la forma ya descrita y siempre paralelamente con geles para proteínas. La tinción se efectuó siguiendo la técnica de Weinbaum and Markman (141). Inmediatamente después de corridos, se retiraron de sus tubos de electroforesis y se incubaron a 37°C en un medio que contenía ATP 4 mM, Cl_2Mg 2 mM y acetato de plomo al 0,4% en Tris 100 mM, pH 7.5. Después de 20 min. de incubación se lavaron con agua destilada para eliminar todo el precipitado de la superficie del gel y se revelaron con una disolución de $\text{S}(\text{NH}_4)_2$ al 1%. Las bandas de ATPasa se visualizan con un color marrón oscuro de sulfuro de plomo, que se puede hacer permanente fijando los geles con acético al 7%.

Purificación de ATPasa soluble por cromatografía en columna.

La purificación de la ATPasa se llevó a cabo por cromatografía en Sephadex G-200 y Sepharosa 4B, en columna de 2,5 cm. de diámetro por 90 cm de longitud. Tanto los geles empleados como las columnas eran de Pharmacia Fine Chemicals. Las columnas fueron empacadas según el método descrito por Fischer (142) empleando una prolongación de la columna del mismo diámetro y suficiente longitud para poder introducir de una sola vez todo el gel necesario y evitar así las posibles roturas del gel, impuestas por una adición fraccionada. Inicialmente, el Sephadex G-200 se equilibró con tampón $\text{CO}_3\text{H}_2\text{NH}_4$ 50 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5, pero en experiencias posteriores tanto la columna de Sephadex G-200 como la Sepharosa 4B fueron equilibradas y eluidas con Tris 50 mM, EDTA 3 mM, pH 7.5. Los volúmenes de exclusión (V_o) determinados como volúmenes de elución del Dextrano azul 2000 fueron de 135 ml para la columna de Sephadex y de 192 ml para la de Sepharosa 4B. Los volúmenes de inclusión ($V_i + V_o$) fueron calculados por el volumen de elución del ClNa detectado con NO_3Ag ó por el del triptófano detectado por espectrofotometría a 279 nm. Por cualquiera de estos medios se obtuvo un volumen de inclusión de 440 ml en la columna de Sephadex G-200 y 400 en la de Sepharosa 4B. La ATPasa soluble fué aplicada a la columna de Sephadex G-200 en un volumen de 4 ml, a una concentración de proteína aproximada de 5 mg/ml, después de haber sido

concentrada con membrana Diaflo PM-50 de Amicón. La elución se efectuó a un flujo constante de 25 ml por hora y a temperatura ambiente. Las fracciones eluidas fueron recogidas en un colector Buchler Fractometre 200 y ensayadas para actividad enzimática y proteínas según los requerimientos de la experiencia.

Algunas veces, se concentraron las fracciones de mayor actividad hasta un volumen de 2 ml aproximadamente y cantidades algo variables de proteína según los casos, y se aplicaron a la columna de Sepharosa 4 B. La elución se efectuó con el mismo tampón, a temperatura ambiente y a 25 ml por hora de flujo. Las fracciones fueron recogidas en un colector Beckman, modelo 133 A ensayándose para actividad y proteína inmediatamente.

Solubilización de NADH-deshidrogenasa

La NADH-deshidrogenasa es una enzima muy débilmente asociada a la membrana de E.coli, por esta razón y su mecanismo de asociación, las condiciones que solubilizan la ATPasa ofrecen un medio muy apto para disociar la NADH₁-deshidrogenasa de la membrana bacteriana (143).

Membranas recién preparadas se resuspendían en CO₃HNH₄ 50 mM - EDTA 3 mM, pH 9, ó bien en Tris de la misma molaridad cuando éste se utilizó en lugar de bicarbonato. La concentración de proteína de membrana en el tampón de extracción era de 1 mg/ml cuando las condiciones eran normales. Si las membranas eran obte-

nidas en presencia de concentraciones crecientes de Cl_2Mg o espermidina, entonces presentaban cantidades de proteína total que variaban desde 1 mg/ml para concentraciones de Cl_2Mg o espermidina muy bajas, hasta 2 mg/ml para las concentraciones más altas. Véase Resultados. Después de mantener resuspendidas durante 20 min. a temperatura ambiente estas distintas preparaciones de membrana se centrifugaban a $37.000 \times g$ en una centrífuga Sorvall, a la misma temperatura y durante 20 min. El sobrenadante que resultaba de esta centrifugación se consideraba como NADH -deshidrogenasa soluble en los ensayos sucesivos.

Ensayo de NADH₁-deshidrogenasa

La actividad enzimática de la NADH -deshidrogenasa tanto en membranas como en fracción soluble o citoplasma se determinó de acuerdo con el método de Saurge (144).

La mezcla de reacción contenía 6 μmoles de NADH, 100 μmoles de fosfato sódico y 0,1 μmoles de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) pH 7.5 en un volumen final de 2,95 ml. La enzima fué añadida en un volumen de 50 μl , iniciándose rápidamente el seguimiento de la reducción del DCIP en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400, a 600 nm equipado con un accesorio de medida automática. La reducción del DCIP se corrigió utilizando como control una cubeta sin NADH -deshidrogenasa. La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que es capaz de reducir 1 μmol de DCIP en 10 min. La unidad de activi-

dad específica como la cantidad de enzima que es capaz de reducir 1 μ mol de DCIP en 10 min. y 1 ml de muestra. Es necesario advertir que 1 ml de extracto contiene la cantidad de proteína solubilizada de 1 ml de suspensión de membranas y que 1 ml de fracción citoplasmática contiene la cantidad de proteínas que quedan en el sobrenadante de la lisis de 1 ml de suspensión de esferoplastos.

La identificación de la NADH deshidrogenasa en geles de poliacrilamida al 7% se hizo siguiendo las indicaciones de Nachbar y col. (145). Los geles se corrian de la forma descrita anteriormente y una vez retiradas de sus tubos de electroforesis se introducían en una mezcla de la siguiente composición: 6 μ moles de NADH, 3 μ moles de cloruro de trifeniltetrazolio, 100 μ moles de Tris pH 7.5 y 100 μ moles de cloruro de cobalto, en un volumen final de 3,4 ml. La reacción se dejó progresar durante 15 min. a 37 °C. La NADH deshidrogenasa se hace patente en forma de bandas rojizas.

Estabilidad de la ATPasa soluble

Los primeros estudios de estabilidad de la ATPasa de E.coli fueron hechos con extracto crudo obtenido con EDTA 3 mM en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM, pH 9. Se prepararon doce fracciones de estos extractos con una concentración de proteína de 37 μ g/ml. en el mismo tampón de solubilización. Se dividieron en tres grupos de cuatro fracciones cada uno, manteniendo un grupo a 4 °C, otro a 24 °C y el tercero a 37 °C. Las fracciones de cada grupo se llevaron a

distintos pHs, concretamente a pH 6, 7, 8 y 9. Todas las fracciones se guardaron durante varios días en las mismas condiciones, determinando periódicamente su actividad, con objeto de conseguir unas condiciones mejores de estabilidad.

En una segunda serie de ensayos se repitieron las mismas fracciones, temperaturas y pHs que en el anterior, y se varió únicamente la concentración de proteína del extracto. En esta experiencia había 230 μg prot/ml y las restantes condiciones eran idénticas. La determinación de la actividad enzimática se efectuó en ambos casos a pH 7.5 y 37°C como queda descrito.

Algunos investigadores (111, 118) han utilizado el glicerol como agente protector de la ATPasa soluble de E.coli. Siguiendo su iniciativa hemos aplicado esta técnica a nuestra fracción soluble. Se prepararon seis alícuotas de extracto crudo de ATPasas obtenido con EDTA 3 mM en $\text{CO}_3\text{H-NH}_4$ 50 mM, pH 9; tres con una concentración de proteína de 37 μg /ml y otras tres con una concentración de 230 μg /ml. Todas se llevaron a pH 7.5 y a una concentración de glicerol del 10%. Una fracción de cada concentración de proteína se puso a 4°C, otra a 24°C y la tercera a 37°C. A tiempo cero, y a distintos tiempos, durante seis días, se hicieron determinaciones de actividad enzimática de las seis fracciones, de acuerdo con las condiciones generales ya establecidas para el ensayo.

Para estabilizar la ATPasa de E.coli, solubilizada con dodecil sulfato sódico, Evans (146) utilizó el dodecanotiol, una sustancia

de idéntico número de átomos de carbono que el detergente, pero de propiedades bien diferentes. Nosotros también hemos aplicado esta técnica en combinación con variaciones en la cantidad de proteína y el pH del medio. Después de obtener extracto crudo con EDTA 3 mM en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM, pH 9 saturado de dodecanotiol, separamos cuatro fracciones; dos con una concentración de proteína de $240 \mu\text{g/ml}$ y otras dos diluidas a la mitad en el mismo tampón de extracción. Una de las fracciones de cada concentración de proteína se llevó a pH 7.5 y la otra se dejó a pH 9. La primera determinación de actividad enzimática se efectuó inmediatamente y las restantes en días sucesivos, siempre en condiciones normales. Todas las fracciones se mantuvieron a temperatura ambiente. La saturación del tampón de solubilización con dodecanotiol se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de ambas sustancias y recogiendo la fase inferior después de 24 horas, o bien añadiendo una parte de dodecanotiol a diecinueve partes de tampón y agitando suavemente. Después de dejarlo reposar sólo se utilizó la fracción inferior.

Fijación de ATP

Los estudios de fijación de ATP a la ATPasa unida a la membrana se realizaron a 0 °C en un volumen de 0,5 ml de medio de reacción. La mezcla contenía $30 \mu\text{moles}$ de Tris pH 7.5, 1 mg de proteína de membrana y cantidades variables de $\text{ATP-}^{14}\text{C}$, y se detenía con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20%. El volumen final de 1 ml se filtraba con filtro Millipore de $0,45 \mu$ de diámetro, en una

bomba de vacío, y a continuación se lavaba el sedimento y el filtro con 10 ml de CINa 0,2 M. El filtro con la proteína retenida en él se disolvía en líquido de centelleo Bray (147) de la siguiente composición: 10% de metanol, 6% de naftaleno, 2% de etilenglicol y 0,5% de butil PBD en dietilendióxido. A continuación se contaba en un contador Nuclear Chicago.

Hay que advertir que los filtros Millipore, dotados de enorme cantidad de cargas eléctricas, necesitaban ser saturados antes de su uso con objeto de lograr experiencias reproducibles. Esto se lograba plenamente con solo lavar el filtro una vez con 10 ml de CINa 0,2 M antes de filtrar la muestra.

Todas las experiencias de fijación se efectuaron en ausencia de tripsina. Aparentemente la inclusión de Cl_2Mg en el medio de reacción en las proporciones adecuadas no hacía variar el modelo de fijación para el sustrato.

La fijación de ATP a la ATPasa soluble requería otra técnica ya que la proteasa soluble era filtrable por el filtro Millipore de $0,45 \mu$. Por esta razón adoptamos el método empleado por Kepes (148), por ser sumamente sencillo y suave. El medio de reacción contenía 0,5 mg de proteína soluble, $5 \mu\text{moles}$ de Tris y cantidades variables de $\text{ATP} - ^{14}\text{C}$ uniformemente marcado en un volumen de 0,1 ml. La reacción se inició con la adición de $10 \mu\text{l}$ de $\text{ATP} - ^{14}\text{C}$ y se paró precipitando la proteína con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 90% de saturación.

Se centrifugó a $8.000 \times g$ durante 10 min, y después de retirar el sobrenadante se lavó una vez la proteína precipitada con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 80% de saturación. El sedimento de este lavado se resuspendió en 0,1 ml de Triton X-100 al 1% y a continuación se contó en un contador Nuclear Chicago, utilizando Bray como líquido de centelleo de la composición ya indicada.

Tanto la reacción como todas las centrifugaciones se efectuaron a 0°C .

Los tiempos elegidos para todas las experiencias de fijación fueron de 1 min.

RESULTADOS

Uno de los problemas planteados al principio de este trabajo y permanentemente presente a lo largo de su desarrollo es la acción de la tripsina sobre la actividad de la ATPasa de E.coli. Con independencia de las diferentes formas en que la presentemos, (mayor o menor concentración de proteína, unida a la membrana, soluble o parcialmente purificada, distintos tampones de solubilización o suspensión, variación de pH, etc.) la ATPasa casi siempre responde de idéntica manera a la acción de la tripsina. Una estimulación aproximada del 100% sobre su actividad básica se puede observar en condiciones normales de ensayo con preparaciones de membrana o vesículas y con fracciones solubles. En otros casos, la dilución de las muestras, el medio de solubilización de elevada fuerza iónica o la extracción con determinados detergentes reduce considerablemente esta activación, sin que en ningún caso podamos asegurar que bajo condiciones bien concretas hayamos eliminado totalmente la estimulación de la enzima por la proteasa. Más adelante trataremos este tema con más detalle presentando resultados concretos elegidos de entre las múltiples experiencias que hemos hecho con el fin de aclarar este problema. Por el momento bástenos saber que la presencia de tripsina en el medio de reacción incrementa la actividad de la ATPasa de E.coli en todas sus formas. La magnitud de este incremento oscila entre un 70%

y un 100% sobre la actividad básica de la enzima, para concentraciones óptimas de sustrato, pero puede disminuirse variando algunas condiciones, como son la concentración de la proteína en el medio de reacción y otras.

Solubilización de la ATPasa de E.coli

Siempre que se inicia el estudio de una proteína funcionalmente activa, surge de inmediato el acuciante interés de conocer su actividad no solo in situ, en su microambiente fisiológico, sino también en otros medios, en otros entornos físicoquímicos, donde la enzima puede haber sufrido alteraciones. Y el procedimiento más simple para lograr este efecto, cuando se trata de una proteína asociada a la membrana como la ATPasa de E.coli, es la solubilización; es decir, la separación de la enzima de su normal unión y relación con los restantes componentes de la membrana y su dispersión molecular en una solución salina tamponada. Un buen método de solubilización de una enzima determinada debe responder a unas condiciones óptimas de selectividad; condiciones que implican un máximo de solubilización de la proteína objeto de estudio y un mínimo para otras proteínas e integrantes de membrana directamente relacionados o no con la proteína en cuestión. Por otra parte el proceso de solubilización debe comportar la suficiente suavidad como para no alterar drásticamente las propiedades cinéticas de una enzima o anularlas por completo.

Con estos principios a la vista hemos emprendido el trabajo

de conseguir una solubilización de la ATPasa de E.coli realmente selectiva. El único procedimiento conocido cuando hicimos este trabajo había sido descrito recientemente por Evans (146). El tratamiento de las vesículas de E.coli con dodecil sulfato sódico al 0,04% en Tris 10 mM y Cl_2Mg 0,2 mM pH 9, rendía una notable cantidad de proteína pero con baja actividad enzimática, aparte otros inconvenientes que se comentarán más tarde. Por esta razón hemos comenzado por aplicar otras técnicas empleadas con éxito para solubilizar ATPasa de Micrococcus lysodeikticus (149) y de otras bacterias Gram positivas, para terminar describiendo un método rápido y de gran selectividad para la ATPasa de membranas o de vesículas de E.coli.

Efecto de perturbaciones iónicas en la solubilización de la ATPasa de membrana de E.coli.

La tabla I muestra el efecto de la fuerza iónica en distintos lavados de membranas y vesículas con Tris-ClH, a pH 7.5.

En la experiencia A se puede observar una reducida liberación de ATPasa a la fracción soluble cuando los lavados se efectúan con Tris 100 mM. Sin embargo, cuando se baja la fuerza iónica como es el caso del tercer lavado con Tris - ClH 3 mM, se advierte un notable incremento, tanto de unidades de ATPasa como de actividad específica, en ambos tipos de preparación de membranas. Se puede observar que en estas dos fracciones se mantiene la proporción relativa de actividades específicas de las suspensiones iniciales de membranas.

T A B L A I

Efecto de la fuerza iónica en la solubilización de la ATPasa de E.colimediante lavado con tampón Tris a pH 7.5

Las dos columnas encabezadas con un asterisco son membranas o las fracciones solubles procedentes de lavados de membranas; las dos restantes son vesículas o fracciones solubles de vesículas. Las membranas se han puesto como referencia de comparación. Las unidades de ATPasa y actividad específica ya quedan definidas.

	Unidades de ATPasa		Actividad específica	
Membranas	2,07 *	17,5	20,7 *	43,6
Experiencia A				
1º Lavado. Tris 100 mM	0,27	1,14	34	18,3
2º Lavado. Tris 100 mM	0,25	0,77	33	16
3º Lavado. Tris 3 mM	0,57	4,76	68	123
Sedimentos residuales	1,12	6,50	19	36
Experiencia B				
1º Lavado. Tris 30 mM	0,51	1,32	60	27,5
2º Lavado. Tris 30 mM	0,40	0,77	47	18,3
3º Lavado. Tris 3 mM	0,40	3,43	47	102
Sedimentos residuales	0,95	8,8	16	42
Experiencia C				
1º Lavado. Tris 3 mM	0,68	3,18	71	98
2º Lavado. Tris 3 mM	0,41	1,25	46	50
3º Lavado. Tris 3 mM	0,24	1,07	25	79
Sedimentos residuales	0,90	11,8	16	50

Cuando los dos primeros lavados (Experiencia B) son hechos con Tris 30 mM, el efecto de la baja fuerza iónica no es tan manifiesto en el caso de membranas, si bien las vesículas mantienen un comportamiento semejante al experimento anterior.

La experiencia C responde a tres lavados consecutivos con Tris 3 mM. Se ha de notar que ya el primer lavado libera la mayoría de las unidades solubilizadas por estos tratamientos, comportándose los dos tipos de preparación de membranas de una forma muy semejante. Ahora bien, en cualquiera de las experiencias, los sedimentos residuales contienen, como mínimo, un 50% de las unidades iniciales de ATPasa presentes en membranas o vesículas.

Estos resultados confirman que la solubilización de la ATPasa de membrana de E.coli, reseñada en trabajos aparecidos mientras se preparaba esta tesis (118, 111) es sólo una solubilización parcial, y permiten sugerir que la cantidad de enzima liberada por perturbaciones iónicas corresponde a una porción de la ATPasa total unida a la membrana.

Todas las determinaciones de actividad enzimática constatadas en esta Tabla I fueron medidas en presencia de tripsina en el medio de reacción. Los resultados hallados en ausencia de tripsina son totalmente semejantes a éstos, aunque las actividades detectadas fueron inferiores como era de esperar, razón por la cual se omiten para dar claridad a la Tabla.

Una diferencia, no obstante, existe que parece relacionar de algún modo la concentración de Tris como tampón de extracción con la acción de la tripsina, pero de ella se hablará más adelante en la Tabla VI.

Como la eficacia de estos lavados parece limitada, hemos variado otras condiciones de experimentación, para dilucidar si la limitación se debía al método o a la enzima. La figura 3 examina la influencia del pH y concentración de proteína en la solubilización con Tris 3mM. El comportamiento de vesículas y membranas es semejante, salvo una pequeña caída en las unidades de ATPasa liberada de vesículas a pH alcalino. Por lo demás el efecto del pH no marca una importancia relevante. Lo que es más manifiesto es el incremento obtenido cuando la extracción se efectúa a una dilución de 1 volumen de suspensión inicial por siete volúmenes de líquido de extracción. La solubilización obtenida por este medio fué aparentemente de un 80% de la actividad original, y las actividades específicas de estas fracciones solubles se incrementaron hasta 38 unidades/mg para fracción de membranas y 125 unidades para preparación de vesículas. Sin embargo, los residuos de extracción todavía contenían cantidades apreciables de ATPasa unida a la membrana. Los resultados presentados sugieren un incremento en las unidades totales de ATPasa y una solubilización incompleta.

Solubilización de la ATPasa con EDTA

Con el fin de conseguir una mejor solubilización, tratamos las preparaciones de membrana con EDTA al objeto de eliminar los catio-

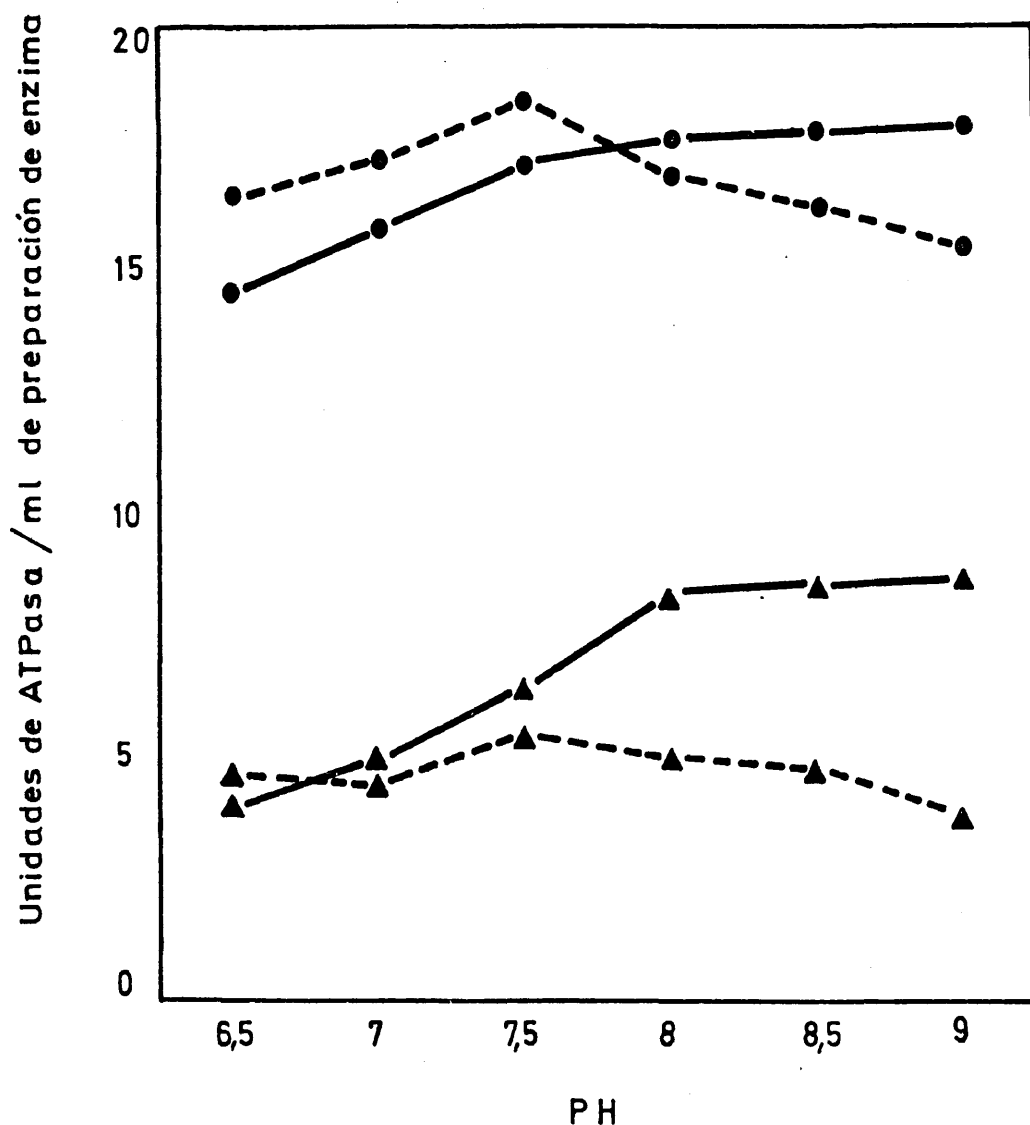


Fig. 3 - Efecto del pH en la solubilización de la ATPasa de membrana de E.coli a distintas concentraciones de proteína, con Tris 3 mM.

▲—▲ ATPasa soluble de membranas a dilución 1:1 ●—● Fracción soluble de membranas a dilución 1:7. ▲---▲ Fracción soluble de vesículas a dilución 1:1. ●---● Fracción soluble de vesículas a dilución 1:7.

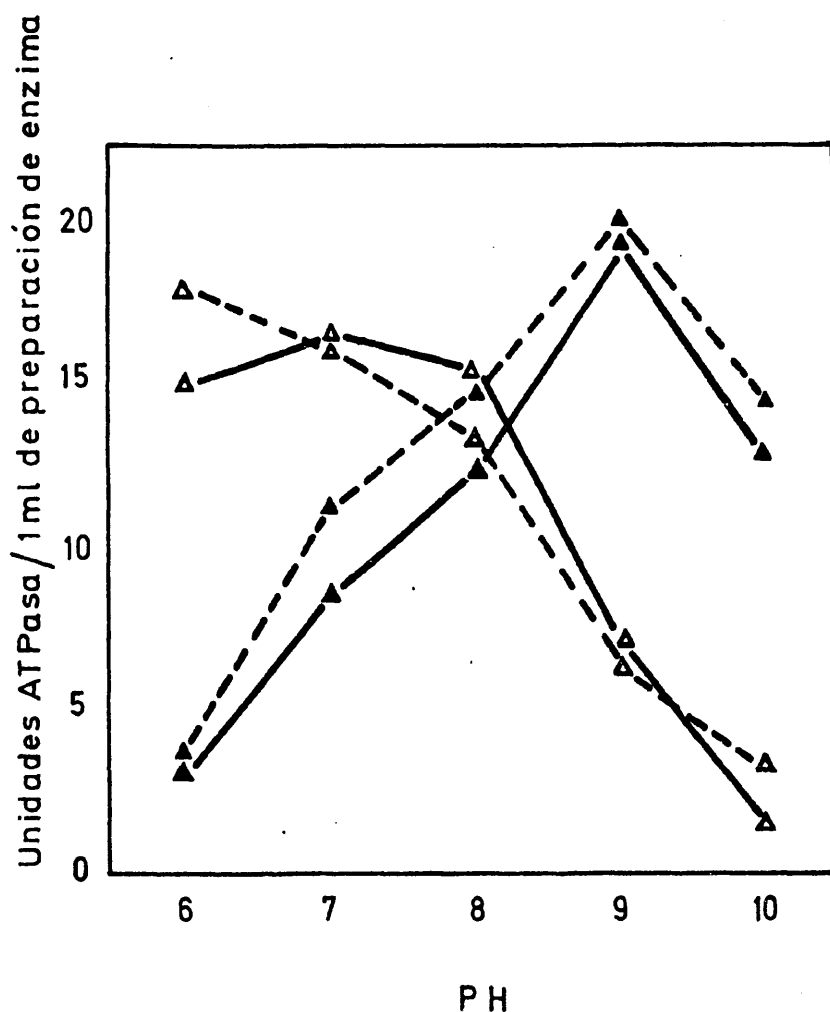


Fig. 4 - Efecto del pH en la solubilización de la ATPasa mediante EDTA 5 mM - $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM a diferentes pH conteniendo EDTA 5 mM. Todos los ensayos de actividad están hechos en presencia de tripsina. ATPasa soluble: ▲—▲ de membranas; ▲---▲ de vesículas. ATPasa de sedimentos residuales: Δ—Δ de membranas; Δ---Δ de vesículas.

nes divalentes. Los primeros experimentos con EDTA 5 mM mostraron un notable aumento en el número de unidades enzimáticas solubilizadas, razón por la cual, determinamos estudiar las mejores condiciones de solubilización con este agente.

La Fig. 4 manifiesta el efecto del pH en la liberación de ATPasa por EDTA 5 mM en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM. Durante estas extracciones no se alteraron las concentraciones de proteína de su valor inicial. La gráfica muestra la correspondencia existente entre el incremento de actividad ATPásica en las fracciones solubles y la reducción de la misma actividad en los residuos despojados de la enzima. La solubilización alcanza un máximo para valores alcalinos de pH (9.0), y no muestra ninguna diferencia respecto al tipo de membrana que se utilice. Comparados estos resultados con los anteriores obtenidos en condiciones similares se advierte una notable diferencia. Allí solubilizábamos un máximo de 6 unidades/ml, mientras con EDTA llegamos a 20 unidades/ml, lo que significa un efecto importante del EDTA en la liberación de la ATPasa.

Desde que Racker en 1962 (150) descubrió una estimulación por CO_3H^- de la ATPasa mitocondrial, han sido varios los investigadores que han vuelto a tratar este tema con ATPasas procedentes de otras fuentes, (151, 152, 153).

El examen efectuado por nosotros sobre la acción de este anión en la ATPasa de *E. coli*, nos dió como resultado un incremento de actividad de un 20% aproximadamente para las membranas y su frag

T A B L A II

Efecto comparativo del Tris y $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ en la solubilización de la

ATPasa de membrana de *E. coli*

La extracción de las membranas y vesículas se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos ya con Tris 50 mM ya con $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM pH 9, en presencia de EDTA 5 mM. La concentración de proteína en estos tampones se mantuvo idéntica a los valores originales de suspensión de membranas. Todas las actividades están determinadas en presencia de Tripsina.

Preparación	<u>ATPasa (unid./ml)</u>		<u>Incremento en %</u>		<u>Act. esp. (unid./mg)</u>		<u>Incremento en %</u>	
	Membr.	Vesículas	Membr.	Ves.	Membr.	Vesículas	Membr.	Ves.
Preparación con Tris	19,14	10,43	-	-	134,2	158,8	-	-
Preparación con $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$	22,71	15,86	18,6	50	167,0	396,5	24,4	150

ción soluble. El efecto sobre la solubilización se ha puesto de manifiesto sustituyendo el $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM por Tris de igual molaridad en el ensayo de extracción con EDTA. La Tabla II muestra los resultados comparativos de estos dos tampones. El incremento de unidades de ATPasa observado es del mismo orden que el obtenido cuando el CO_3H^- se añade directamente al medio de reacción, lo cual pone de manifiesto que este anión no potencia el efecto solubilizante del EDTA. El aumento es más notable en la actividad específica; pero esto no es más que el reflejo de una menor cantidad de proteína total liberada a la fracción soluble. En todos los casos el $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ solubiliza menos cantidad de proteína total que el Tris de idéntica molaridad.

Hay que notar el incremento de actividad conseguida en el caso de vesículas. Un 50% de la actividad enzimática total y un 50% en la actividad específica parecerían apuntar hacia ese doble efecto del CO_3H^- ; mejor solubilización y mayor actividad, sin embargo, dadas las características de este segundo tipo de membranas no creemos que se pueda afirmar nada definitivo a este respecto.

Conocido el efecto de la concentración de proteínas a la liberación de ATPasa con Tris 3 mM, hemos juzgado de interés estudiar el mismo efecto en las nuevas condiciones de solubilización. Los resultados expresados en la Tabla III presentan ciertas características de interés. El EDTA 5 mM en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ a pH 9 solubiliza casi todas las unidades de ATPasa si se comparan con la actividad inicial en cualquiera de los tipos de membrana, con un rendimiento que va del 85 al 90%

para diluciones 1:1 hasta un 250% para diluciones 1:7. Las actividades específicas, notablemente elevadas, son una clara indicación de la acción específica del EDTA en la liberación de la ATPasa de las distintas preparaciones de membranas de E.coli. Se puede pensar que el elevado rendimiento en unidades de ATPasa es el resultado de una activación de la enzima por simple dilución de la muestra, no obstante, esto no es toda la verdad. Los residuos de membranas de la primera extracción todavía contenían importantes niveles de ATPasa, de tal manera que, en el peor de los casos, la suma de esta actividad con la de su correspondiente fracción soluble daba por resultado un neto incremento en unidades enzimáticas. Teniendo en cuenta que estos residuos no estaban diluidos, es claro que el hecho de la sola dilución no da cuenta de todo el incremento observado. Por consiguiente creemos que la dilución también favorece la solubilización. Un segundo lavado, de los residuos ya extraídos, en idénticas condiciones que el primero liberó nuevas unidades de enzima a la fracción soluble, con una actividad específica mucho menor, exponente claro de una solubilización de proteína menos selectiva. Los residuos del segundo lavado conservan una pequeña actividad ATPásica, tanto menor cuanto mayor es la cantidad de unidades solubilizadas y que nunca supera un 20% de las unidades totales, las cuales siempre exceden del 100% de la ATPasa originariamente medida en las membranas.

Estos resultados nos permiten concluir que el EDTA solubiliza selectivamente y en forma casi total la ATPasa de membranas de

T A B L A III

Efecto de la concentración de proteína en la liberación de ATPasa de *E.coli*
con EDTA - CO₃HNH₄

Después de centrifugar alícuotas de 1 ml de suspensión de membranas y vesículas se resuspendieron en diferentes volúmenes, como se indica en la Tabla, de EDTA 5 mM CO₃HNH₄ 50 mM, pH 9. Las actividades enzimáticas de las fracciones solubles fueron ensayadas en presencia de tripsina. Las unidades de actividad enzimática están referidas a 1 ml de volumen inicial de suspensión.

Preparación	Dilución en volumen	Unidades ATPase/ml		% de actividad		Act. esp. (Unid./mg)	
		Membr.	Vesículas	Membr.	Vesículas	Membr.	Vesículas
suspensión inicial	-	23,7	17,5	100	100	23,7	43,6
fracción soluble	1:1	21,1	14,5	89,0	83,0	163,6	431,0
fracción soluble	1:3	32,0	28,1	135,0	161,0	213,4	325,3
fracción soluble	1:7	51,7	44,8	218,1	256,0	282,4	319,5
fracción soluble	1:1	6,0	3,5	25,3	19,8	61,2	130,5
fracción soluble	1:3	9,1	3,4	38,4	19,6	70,5	95,0
fracción soluble	1:7	12,8	5,9	54,0	34,0	80,0	106,3
iduos membr. de	1:1	6,0	1,3	25,3	7,3	8,5	7,4
iduos membr. de	1:3	5,2	1,0	21,9	5,6	8,1	6,0
iduos membr. de	1:7	3,6	0,7	15,2	4,1	6,3	5,8

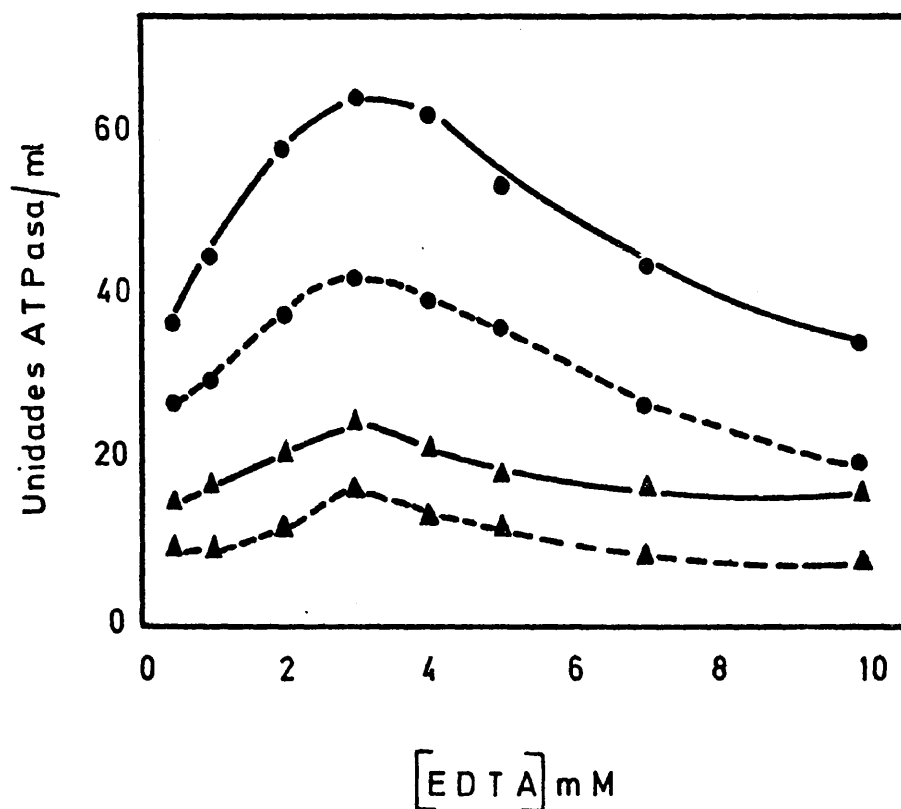


Fig. 5 - Efecto de la concentración de EDTA en la solubilización de ATPasa en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM, pH 9. Los dos tipos de membrana fueron extraídos a dos diluciones 1:1 y 1:7. Todas las actividades fueron determinadas en presencia de tripsina. Dilución 1:1: ▲—▲ fracción soluble de membranas; ▲---▲ fracción soluble de vesículas. Dilución 1:7: ●—● fracción soluble de membranas; ●---● fracción soluble de vesículas. Las unidades están dadas por ml de suspensión de membranas o de vesículas.

E.coli, en cualquiera de sus preparaciones, así como incrementa su actividad total.

Con el fin de encontrar unas condiciones óptimas hemos examinado cual era la mejor concentración de EDTA a este respecto. La Fig. 5 responde a este interrogante, mostrándonos un máximo de solubilización para una concentración de EDTA 3 mM. La dilución de proteína hace más patente este máximo, llegando en ambas clases de membranas a un 300% de las unidades de ATPasa medidas inicialmente. Los residuos lavados sólo contenían un 5% de la actividad ATPásica inicial y menos de un 2% de la total.

Por consiguiente podemos concluir que bajo estas condiciones EDTA 3 mM en $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM, pH 9, a dilución 1:7 se solubiliza toda la ATPasa de membrana de E.coli en cualquiera de sus dos tipos de preparación.

Solubilización de la ATPasa con detergentes

Los detergentes han sido ampliamente utilizados para solubilizar enzimas de membrana, como se puede apreciar por la revisión de Steck y col. (122). Por esta razón parecía lógico comparar nuestro procedimiento de extracción y sus características con las características y grado de solubilización de la ATPasa por medio de estos detergentes. La tabla IV muestra los resultados pertinentes para ambos tipos de preparación de membranas. Si los juzgamos por comparación con los de EDTA, los rendimientos de ATPasa soluble obtenida mediante detergentes, son notablemente bajos; lo mismo hemos de afirmar si

T A B L A IV

Solubilización de la ATPasa de membrana de E.coli con detergentes

Se tomaron alícuotas de suspensión de membranas a la concentración original de proteína (1 mg/ml para membranas y 0,5 mg/ml para vesículas) y se resuspendieron en Tris 30 mM pH 7,5 conteniendo los detergentes a las concentraciones indicadas: Dodecil sulfato 0,04% (v/v), Desoxicolato 1% (w/v), Nonidet 1% (v/v) y Triton X-100 0,2% (v/v). Los ensayos de ATPasa se determinaron en presencia y ausencia de tripsina en todos los casos.

Preparación	Unidades de ATPasa/ml		Act. esp. (unidades/mg)	
	Membranas	Vesículas	Membranas	Vesículas
luble con dodecil sulfato	4,86	3,66	64,8	40,1
luble con " " + tripsina	4,71	3,88	62,8	42,3
sidual de dodecil sulfato	3,29	0,57	6,1	3,1
sidual de " " + tripsina	3,57	0,43	6,7	2,3
luble con deoxicolato	6,00	2,57	55,0	16,2
luble " " + tripsina	5,86	2,66	53,8	16,7
sidual de deoxicolato	2,57	0,14	5,0	1,1
sidual de " " + tripsina	2,43	0,57	4,7	4,2
luble con Nonidet	8,71	2,71	22,3	13,6
luble " " + tripsina	14,29	4,30	36,6	24,0
sidual de Nonidet	8,57	3,00	22,5	20,8
sidual de " " + tripsina	12,86	4,57	34,9	31,7
luble con Triton	10,43	4,71	28,6	27,0
luble " " + tripsina	15,00	6,94	41,6	39,0
sidial de Triton	9,14	3,43	23,0	22,1
sidual de Triton + tripsina	14,29	5,43	36,0	34,9

nos referimos a las actividades específicas, las cuales aunque superiores a las suspensiones iniciales de membrana son siempre muy inferiores a las conseguidas con EDTA.

A la vista del bajo contenido de actividad ATPásica de los residuos de extracción con dodecil sulfato sódico y desoxicolato sódico, queremos hacer notar que el rendimiento de ATPasa total en estos dos casos es especialmente bajo, mientras que el Triton X-100 y el Nonidet parecen repartir la ATPasa entre las dos fracciones con una actividad enzimática total próxima al 100% de la actividad inicial; y actividades específicas muy semejantes para las dos fracciones, residual y soluble.

Las concentraciones de detergente que hemos utilizado son las que hemos encontrado ya descritas en la literatura. El dodecil sulfato sódico al 0,04% ha sido empleado por Evans (146). El desoxicolato (1% w/v) y el Nonidet (1% v/v) a las concentraciones normalmente empleadas (122), mientras el Triton X100 tuvo que ser reducido a una concentración de 0,2% (v/v) para evitar las dificultades que este detergente originaba en la determinación de Pi.

Otro aspecto de interés es que la ATPasa solubilizada con dodecil sulfato y desoxicolato no muestra estimulación por tripsina, en tanto que las fracciones solubles de Triton X-100 y Nonidet al igual que sus fracciones residuales no han perdido esta propiedad en grado apreciable.

Todas estas características diferenciales pudieran ser un reflejo de distintas propiedades disociativas y desnaturalizantes de los detergen

tes, tanto más probable cuanto que el dodecil sulfato y desoxicolato parecen tener una acción particularmente desnaturalizante sobre las vesículas de E.coli.

Sea como fuere, parece lógico concluir una vez más, que la solubilización de ATPasa con EDTA a pH alcalino es el procedimiento más selectivo y completo y el que proporciona la mejor recuperación de actividad enzimática.

Estimulación de la ATPasa por tripsina

Ya hemos presentado el problema de la activación por tripsina de la ATPasa de E.coli. Enzima ligada a la membrana, soluble y parcialmente purificada está igualmente afectada por esta característica, lo que permite excluir con toda claridad, el concepto de enzima críptica, aplicado a la ATPasa de la membrana celular. Las preparaciones parcialmente purificadas e incluso las solubles, nos llevan a la conclusión de que no es el entorno próximo a la enzima el que está directamente implicado en la acción de la proteasa, sino la propia ATPasa en su estructura o en su conformación.

La Tabla V expresa la relación existente entre la estimulación por tripsina y la concentración de proteína en el medio de reacción. Con independencia de que la enzima se encuentre asociada a la membrana o en forma soluble, su comportamiento frente a la tripsina viene manifestado siempre por la misma constante; disminución gradual de la acción de la proteasa como respuesta al descenso de concentración de en-

Estimulación por tripsina de la ATPasa de *E.coli* en función de la concentración de Proteína.

Las unidades de ATPasa están referidas a 1 ml de suspensión de membranas con una concentración de proteína de 1, 0,5, 0,25 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o bien a 1 ml de fracción soluble con una concentración de 200, 140, 100, 70, 50 y 20 $\mu\text{g/ml}$. La proteína indica la cantidad total de proteína en el medio de reacción. Los resultados son promedios de varias experiencias. La fracción soluble de EDTA fué obtenida con EDTA 3 mM en CO_3HNNH_4 50 mM pH 9 y la de Tris fué obtenida con Tris 3 mM pH 7.5.

Preparación	Proteína (μg)	Unidades ATPasa/ml	Actividad específica	Incremento en %
Membranas	100	7,5	7,5	
Membranas + tripsina	100	15,0	15,0	97
Membranas	50	5,5	11,0	
Membranas + tripsina	50	9,7	19,4	76
Membranas	25	3,5	14,0	
Membranas + tripsina	25	5,8	23,0	67
Membranas	10	2,0	21,0	
Membranas + tripsina	10	2,9	29,0	42
Fracción soluble con EDTA	20	14,3	95,3	
Fracción soluble + tripsina	20	22,8	152,0	60
Fracción soluble con EDTA	10	12,3	123,0	
Fracción soluble + tripsina	10	18,6	186,0	50
Fracción soluble con EDTA	5	9,4	188,3	
Fracción soluble + tripsina	5	11,4	228,0	22
Fracción soluble con EDTA	2	4,3	215,1	
Fracción soluble + tripsina	2	4,95	247,0	17
Fracción soluble de Tris	14	12,3	86,6	
Fracción " " + tripsina	14	19,1	134,5	55
Fracción soluble Tris	7	5,3	106	
Fracción " " + tripsina	7	5,7	114	8

zima en el medio de ensayo de actividad. Por el contrario, la concentración de fracciones diluidas se acompaña de nuevo, en todos los casos, de un incremento en la acción de la tripsina, totalmente comparable al observado antes de efectuar la dilución.

Tal comportamiento no se afecta cuando se utiliza Tris 50 mM como tampón de solubilización con EDTA en lugar de $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ de igual molaridad.

Estos hallazgos indican claramente una supresión del efecto de la tripsina por el factor dilución. Las variaciones en la concentración es tán dando origen a nuevas situaciones de equilibrio entre la enzima y el medio y estas situaciones pueden traducirse en una disociación o separación de algún componente íntimamente ligado a la ATPasa o simplemente en un cambio de conformación que haga innecesaria o menos eficaz la acción de la tripsina.

Un aspecto aparentemente diferente es el que se resume en la Tabla VI. Los cambios de fuerza iónica expresados por las distintas con centraciones de Tris parecen tener efectos drásticos sobre la acción de la Tripsina. Sin embargo el problema no se puede simplificar. Si bien es cierto que a altas concentraciones de Tris la estimulación por tripsina de la fracción soluble es baja, también lo es que esa misma fracción pre senta una pequeña actividad ATPásica, y fracciones con baja actividad enzimática suelen tener reducida su estimulación por tripsina. Ambos as pectos deben ser considerados.

T A B L A VI

Activación por tripsina sobre ATPasa solubilizada a distintas fuerzas iónicas y con detergentes.

Las fracciones solubles se identifican por los tampones empleados en la extracción de la enzima.

Fracciones solubles	<u>Incremento de actividad en %</u>	
	Membranas	Vesículas
Tris 100 mM pH 7,5	2.5	1.4
Tris 30 mM pH 7,5	31.0	5.4
Tris 3 mM pH 7,5	91.0	38.4
Dodecil sulfato sódico 0,04 %	0.0	6.0
Desoxicolato sódico 1% w/v	0.0	3.5

La ATPasa solubilizada en dodecil sulfato y desoxicolato es insensible a la tripsina cuando procede de membranas. Los incrementos en contrados en vesículas son pequeños y pueden considerarse incluidos dentro del error experimental. La causa que vuelve estas preparaciones insensibles a las proteasas o con sensibilidad disminuida, puede encontrar una explicación análoga a la propuesta para la dilución. El poder disgregador de estos detergentes y en parte también del Tris a altas concentraciones, determinaría una transformación en la enzima que haría innecesario el efecto de la tripsina.

Queremos resaltar que ambos tipos de preparación de membrana se comportan de forma similar a este respecto, tanto si las utilizamos como suspensión de membranas o en sus fracciones solubles.

Los resultados presentados hasta aquí podrían sugerir que la activación debida a la tripsina es el reflejo de la destrucción por la proteasa de un inhibidor, regulador o ambos a la vez que estaría íntimamente asociado con la moléculas de ATPasa y que probablemente formaría parte de su estructura cuaternaria.

Inhibidores de este tipo son bien conocidos en ATPasas de mitocondrias y cloroplastos (154, 155).

Salton y col. (156) han sugerido la presencia de reguladores semejantes en Micrococcus lysodeikticus.

En las experiencias anteriores veníamos usando una concentración de tripsina de 0,2 mg/ml en el medio de reacción, pero necesitábamos saber cuál era la concentración óptima de la proteasa para la me-

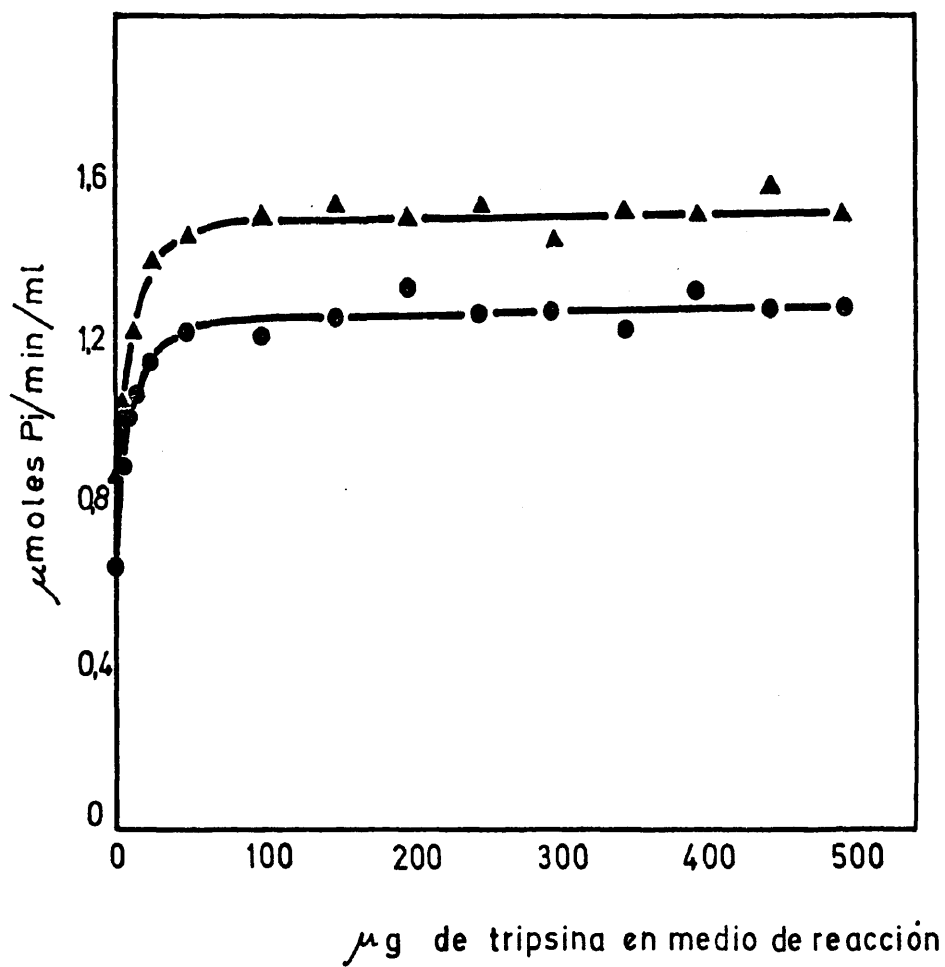


Fig. 6 - Estimulación por tripsina en función de su concentración. La actividad fué determinada normalmente en presencia de concentraciones crecientes de tripsina, y viene expresada en moles Pi por min. y ml de suspensión de membranas o por ml de enzima soluble correspondiente a igual cantidad de membranas. ●—● ATPasa ligada a la membrana; ▲—▲ ATPasa soluble.

por actividad ATPásica. La Fig. 6 nos muestra la actividad enzimática como una función de la concentración de tripsina. Tanto para la ATPasa unida a la membrana como para la soluble el incremento de la actividad es rápido al aumentar ligeramente la concentración de tripsina pero solo a bajos niveles de la proteasa. Por encima de una concentración de 0,1 mg/ml la actividad ATPásica no se altera aunque se siga aumentando la cantidad de tripsina durante un largo rango de concentraciones.

Acordes con estos resultados continuaremos utilizando la misma concentración que hasta el presente, es decir, 0,2 mg/ml en el medio de reacción.

Acción proteolítica de la tripsina sobre la ATPasa.

La tripsina es una enzima proteolítica con especificidad para ciertos enlaces peptídicos, pero inespecífica respecto a las proteínas como tales. En consecuencia debíamos esperar que la ATPasa fuera sustrato de la tripsina en condiciones normales. Por esta razón hemos estudiado la sensibilidad de la ATPasa a la digestión triptica y las posibles implicaciones de la última enzima en la actividad y estabilidad de la primera.

La Fig. 7 muestra el efecto de la tripsina sobre la ATPasa en distintas condiciones de actuación. Algunos aspectos merecen ser resaltados. En ausencia de inhibidor y ATP la fracción soluble presenta mayor sensibilidad que la unida a la membrana. La razón más inmediata radica en que la cantidad de tripsina fué la misma en ambos casos,

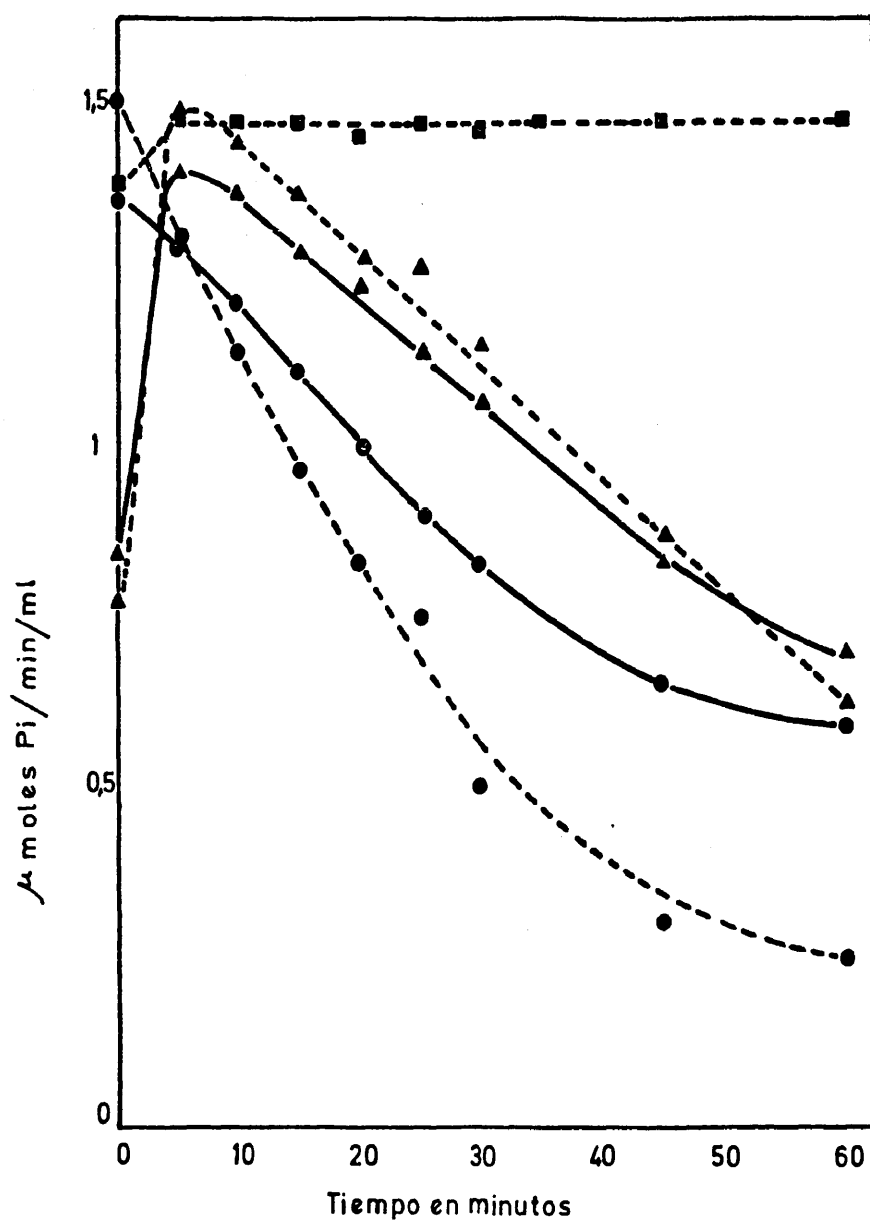


Fig. 7 - Proteolisis de la tripsina sobre la ATPasa de *E. coli*.
Muestras con ATPasa y tripsina se incubaron a 37°C y a diferentes tiempos, añadiendo, en algún caso, inhibidor de tripsina o ATP. La relación tripsina - ATPasa fué la óptima obtenida según la Fig. 6. Después de la incubación se llevaron las muestras a temperatura ambiente y se determinó la actividad ATPásica en condiciones normales. La incubación fué hecha de la siguiente forma: ●—● ATPasa unida a membranas + tripsina; ○---○ ATPasa soluble + tripsina; ▲—▲ ATPasa unida a membranas + tripsina y parada de la reacción con inhibidor de tripsina; ▲---▲ ATPasa soluble + tripsina y parada de la reacción con inhibidor de tripsina; ■---■ ATPasa soluble + tripsina + ATP.

mientras la concentración de proteína de la membrana es mucho mayor que en la fracción soluble. No obstante no se puede descartar que la ATPasa soluble esté más expuesta a la acción proteolítica que la asociada a la membrana. En cualquiera de los casos, media hora de incubación reduce la actividad ATPásica en más de un 50% de su actividad original.

Cuando después de los mismos tiempos de incubación se detiene la actividad proteolítica por adición de inhibidor de tripsina, se advierte que a tiempos inferiores a cinco minutos prevalece la acción estimuladora de la proteasa, y de este tiempo en adelante comienza a manifestarse su efecto proteolítico. Este fenómeno parece indicar que la acción estimuladora de la tripsina sobre la ATPasa es debida quizás a la rotura de un enlace muy sensible a la proteasa y por supuesto mucho más sensible que aquellos que ocasionan la destrucción de la ATPasa. Esta sugerencia viene apoyada por el hecho de que la acción estimuladora de la tripsina no es necesariamente simultánea con la capacidad hidrolítica de la ATPasa. Esto permite apuntar la posibilidad de obtener una ATPasa homogénea y permanentemente estimulada por haber sido sometida con anterioridad a la acción de la tripsina.

En la Fig. 8 se muestran resultados paralelos a los anteriores, en los que se pone de manifiesto la marcada relación existente entre la sensibilidad de la ATPasa a la tripsina y la presencia de Mg^{++} en el medio de incubación. Es claro que el Mg^{++} ha aumentado la facilidad digestiva de la ATPasa, muy acusadamente en la fracción soluble y un poco menos en la unida a membrana, pero en cualquiera de los

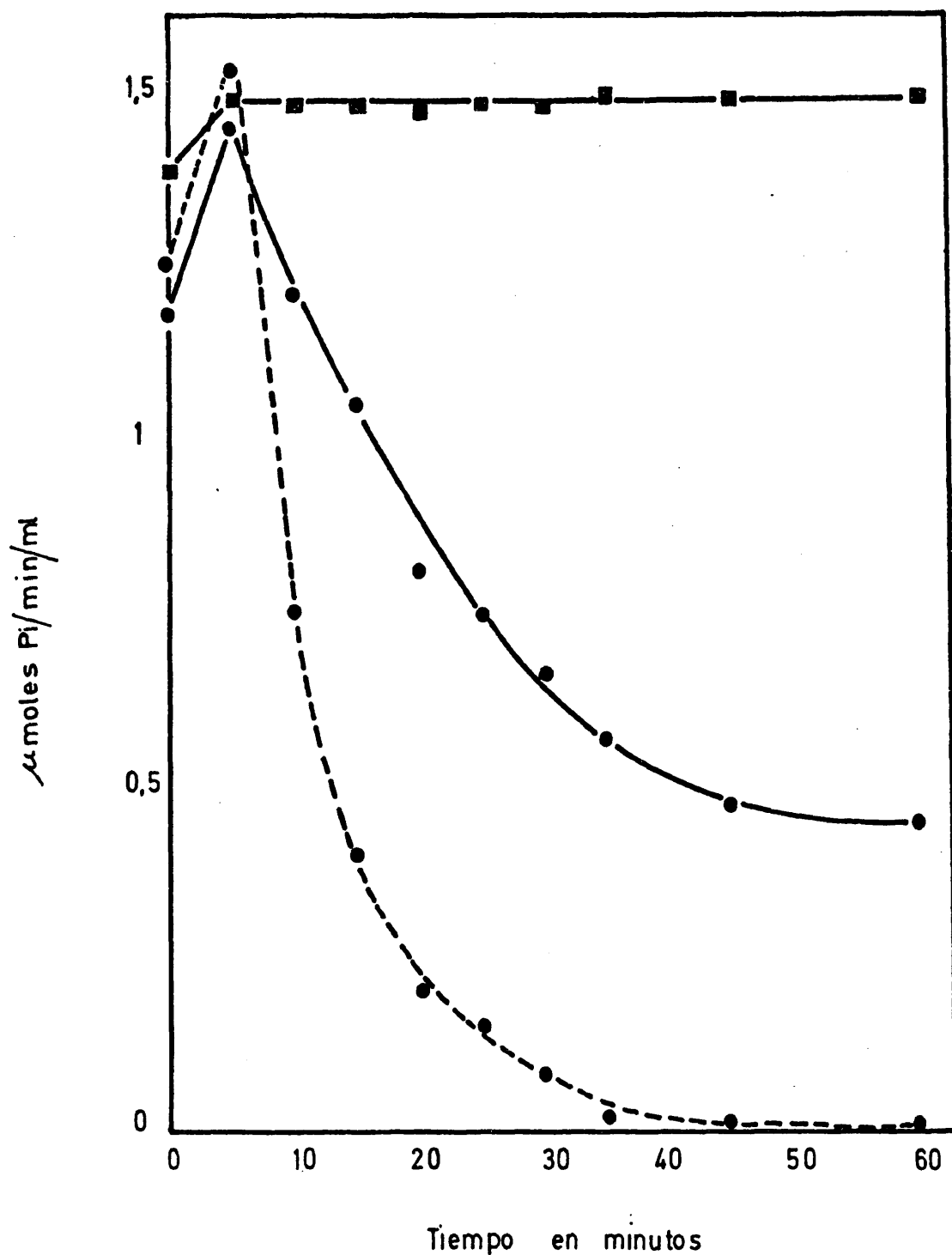


Fig. 8 - Efecto proteolítico de la tripsina sobre la ATPasa de E. coli. Las condiciones de ensayo son idénticas a las de la Fig. anterior. El medio de incubación contenía: ●—● ATPasa unida a membranas + tripsina + Mg²⁺; ●---● ATPasa soluble + tripsina + Mg²⁺; ●-■- ATPasa unida a la membrana + tripsina + ATP. La concentración de ATP fué la misma que la del medio de ensayo de la actividad enzimática. Después de la incubación se efectuó la determinación de actividad ATPásica en condiciones normales.

casos la destrucción de la enzima es considerablemente mayor que en ausencia del catión. Estos resultados, similares a los hallados por Bond (157) apuntan hacia una fijación del Mg^{++} a la ATPasa acompañada de un cambio de conformación que favorecería el ataque por la proteasa; interpretación que aparece apoyada en el hecho de que el Mg^{++} es un elemento indispensable para la actividad enzimática. Cuando estudiemos la cinética de saturación de Mg^{+2} y ATP volveremos a corroborar esta afirmación.

Los resultados anteriores indican claramente que la ATPasa es un buen sustrato de la tripsina y que incluso se puede mejorar en presencia de Mg^{++} , sin embargo también se puede suprimir su capacidad de ser atacada por la tripsina. Las figuras 7 y 8 demuestran que la presencia de ATP en el medio de incubación confiere resistencia a la ATPasa frente a la tripsinólisis. Experiencias efectuadas en idénticas condiciones y tiempos que las precedentes mantienen la actividad enzimática inalterada no obstante la presencia de tripsina.

Hemos visto la activación por tripsina de la ATPasa de E.coli y su digestión por la proteasa como una función de determinadas condiciones, entre ellas la acción protectora del sustrato. Nos importaba conocer qué concentraciones de ATP eran necesarias para ejercer este efecto protector. La Tabla VII nos indica que por debajo de una determinada concentración de sustrato la estimulación por tripsina decrece en relación directa a la disminución en la concentración de ATP, hasta tal punto que a bajas concentraciones de sustrato las muestras de terminadas en ausencia de tripsina tienen mayor actividad que las efec-

T A B L A VII

Acción de la tripsina sobre la ATPasa de E.coli en función de la
 =====
 concentración de sustrato .
 =====

Los incrementos negativos corresponden a una menor actividad de la ATPasa con tripsina en el medio de reacción. La ATPasa soluble fué extraída con EDTA 3 mM - $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ 50 mM a pH 9, a partir demembranas.

[ATP] mM	8	4	2	1,2	0,8	0,4	0,2
TPasa unida a membranas % de activación	63	60	21	13	3	-17	-22
TPasa soluble de activación	64	54	28	14	7	-20	-25

tuadas en su presencia, lo que presupone un efecto proteolítico sobre la ATPasa.

En consecuencia podemos afirmar que la tripsina funciona con estimulación de la ATPasa cuando se utiliza con concentraciones óptimas de sustrato; para concentraciones inferiores los efectos estimulantes se ven contrarrestados por la acción proteolítica.

Solubilización de NADH -deshidrogenasa

Las membranas de Micrococcus lysodeikticus preparadas como se describe por Muñoz y col. (143) conservan más del 80% de la actividad NADH-deshidrogenásica ligada a la membrana; el resto es liberado con el citoplasma al lisar los protoplastos. El tratamiento de estas membranas con un agente quelante como el EDTA 1 mM solubiliza completamente la NADH -deshidrogenasa, no detectándose ninguna actividad en los sedimentos residuales. Detergentes aniónicos como el desoxicolato (143) arrastran la NADH-deshidrogenasa a la fracción soluble acompañada de otras proteínas, pero cuantitativamente con menos eficacia y especificidad que el EDTA. Estos y otros hallazgos llevaron a la conclusión de que la NADH-deshidrogenasa en este organismo debe ser considerada como una enzima perteneciente casi exclusivamente a la fracción de membrana (145).

Sin embargo el comportamiento de la misma enzima en E.coli parece bastante distinto. El citoplasma celular obtenido tal como se describe en Materiales y Métodos lleva consigo un 80% de

la NADH -deshidrogenasa, quedando asociada a la membrana solo un 20% del total. El mantenimiento de mayores proporciones de esta enzima unida a la membrana sólo puede conseguirse protegiendo su asociación a la misma con cationes divalentes como el Mg^{++} o poliaminas.

La Fig. 9 muestra la partición diferencial de la NADH -deshidrogenasa en distintas fracciones, como una función de la concentración de Cl_2Mg en el momento de lisis de los protoplastos y lavados posteriores. Cuando la lisis se efectúa en ausencia de Cl_2Mg el citoplasma bacteriano engloba entre sus componentes un 80% de actividad de la NADH -deshidrogenasa, mientras que únicamente el 20% permanece asociado a la membrana. Concentraciones crecientes de Cl_2Mg acercan e incluso invierten estos porcentajes. Por encima de Cl_2Mg 5 mM, nuevos aumentos del catión no alteran las cantidades netas de actividad que acompañan a cada fracción. Bajo estas últimas condiciones se consigue mantener ligada a la membrana un 60% de la actividad enzimática, en tanto que el otro 40% parece no ser sensible a la acción del magnesio, solubilizándose con entera independencia de la concentración del catión.

La extracción de NADH-deshidrogenasa con EDTA 3 mM es prácticamente total si consideramos que los sedimentos extraídos apenas manifiestan actividades residuales detectables. No obstante la actividad solubilizada por este medio no alcanza nunca el número de unidades enzimáticas totales determinables en la membrana original.

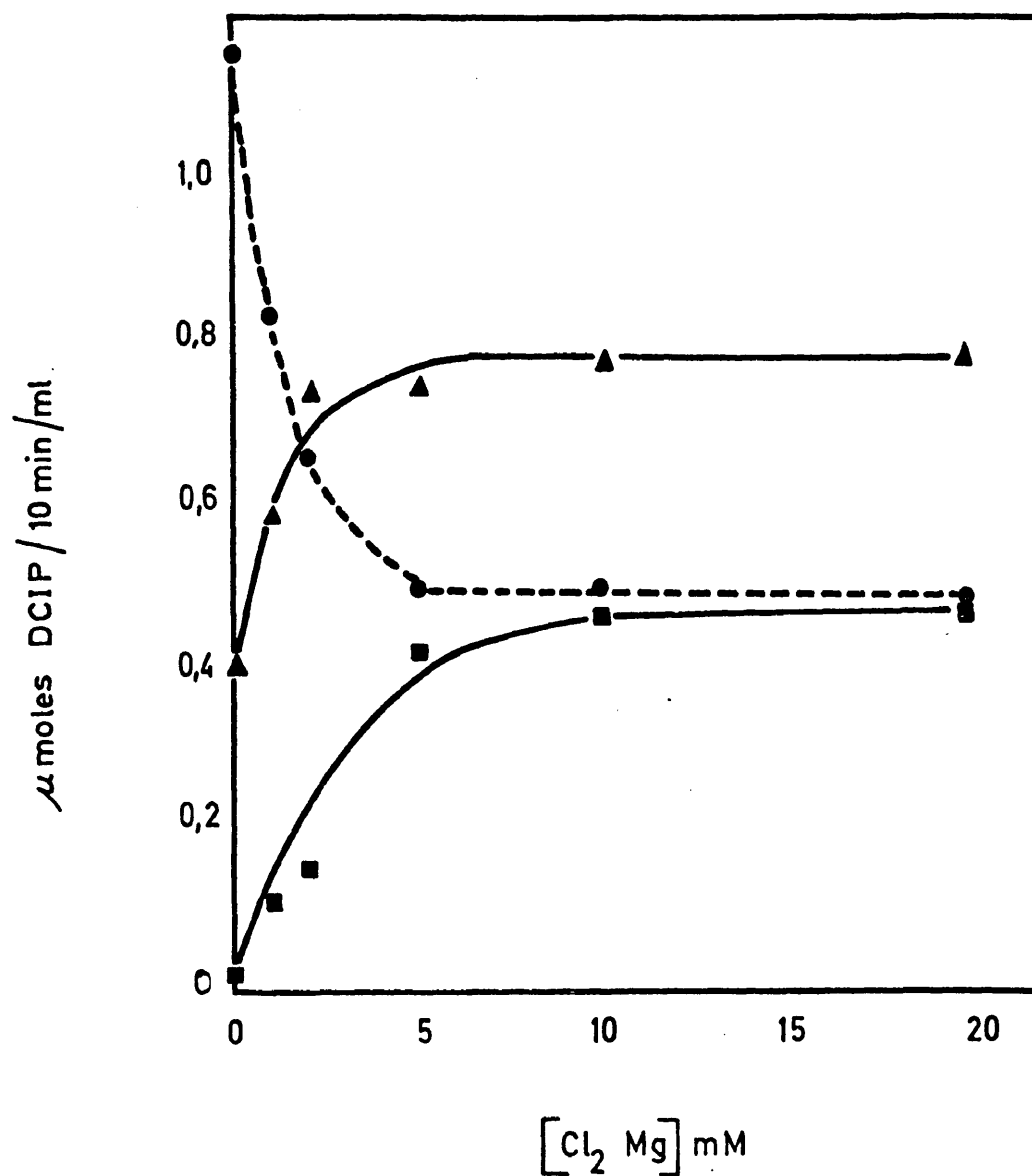
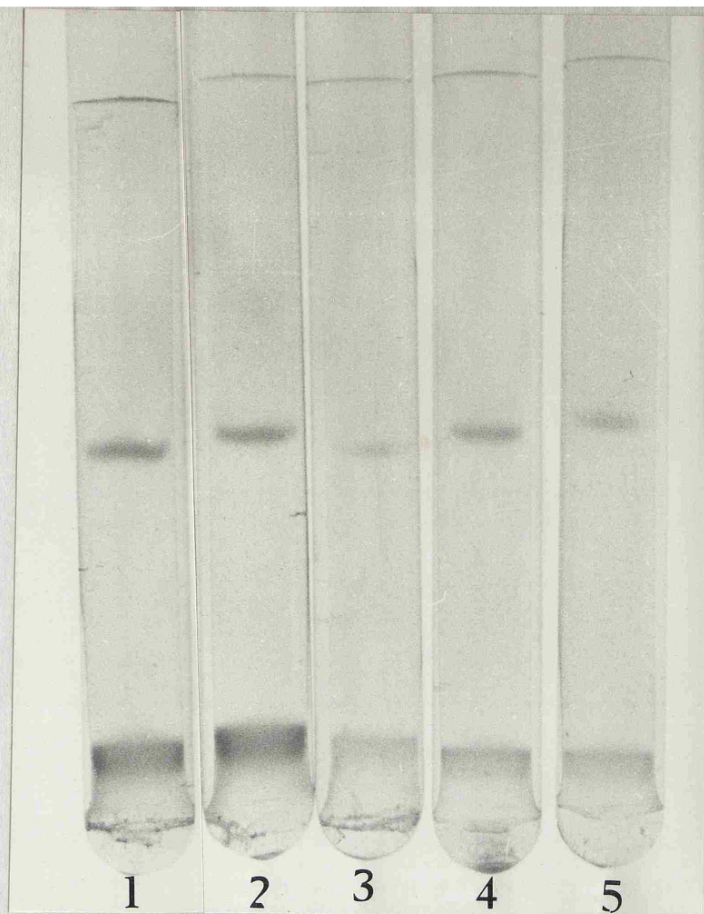


Fig. 9 - Actividad de la NADH-deshidrogenasa, en diferentes estados, como función de la concentración de Cl₂Mg en el tampón de lisis de los protoplastos y lavados siguientes. Las concentraciones de Cl₂Mg están en abscisas. ●----● Actividad medida en el citoplasma celular. ▲—▲ Actividad de la enzima unida a la membrana. ■—■ Actividad de la fracción soluble con EDTA 3 mM.

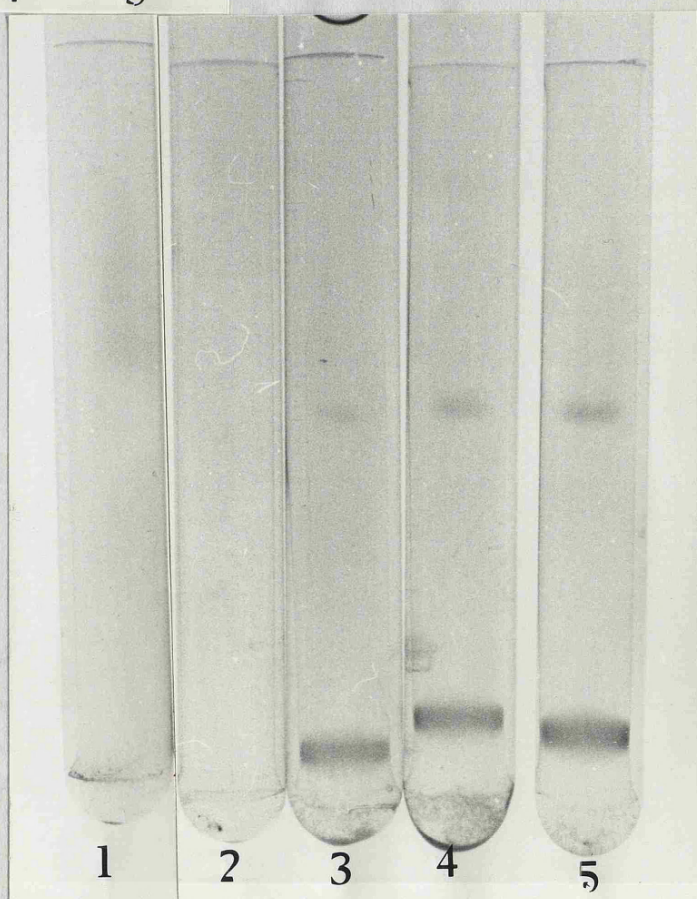
Esto hace suponer, como explicación más inmediata, una pérdida de actividad enzimática debida al proceso de extracción, al tiempo o a otros factores todavía no controlados, sobre todo si tenemos en cuenta la gran inestabilidad de la proteína.

La tinción enzimática de la NADH-deshidrogenasa después de electroforesis en geles de poliacrilamida (158, 159) para las fracciones citoplásmica y soluble con EDTA 3 mM se muestra en la Fig. 10. A mayor concentración de Cl_2Mg se observa una menor densidad de coloración en la banda de NADH-deshidrogenasa correspondiente a la fracción soluble en el citoplasma. Por el contrario la banda de enzima extraída con EDTA 3 mM no se detecta cuando las concentraciones de magnesio fueron bajas. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los de la Fig. 9 y corroboran las determinaciones cuantitativas encontradas en las distintas preparaciones como efecto de la concentración de cationes divalentes.

La permanencia de la NADH-deshidrogenasa asociada a la membrana citoplásmica no es sólo efecto del Mg^{2+} ; sustancias multifuncionales del tipo de las poliaminas ejercen una acción similar e incluso más manifiesta. En la Fig. 11 podemos ver la repartición de la enzima entre las fracciones citoplásmica y membranosa como una función de la concentración de espermidina. La ausencia de esta triamina permite la liberación de más de un 80% de actividad enzimática con los integrantes del citoplasma celular; pero concentraciones crecientes de espermidina ligan más y más NADH-deshidrogenasa a la



a



b

Fig. 10 - Tinción de NADH-deshidrogenasa en geles de poliacrilamida.

a enzima de la fracción citoplásmica; b enzima extraído con EDTA.

Las concentraciones de Cl_2Mg son las siguientes: 1, 0 mM; 2, 1 mM; 3, 2 mM; 4, 5 mM; 6, 20 mM.

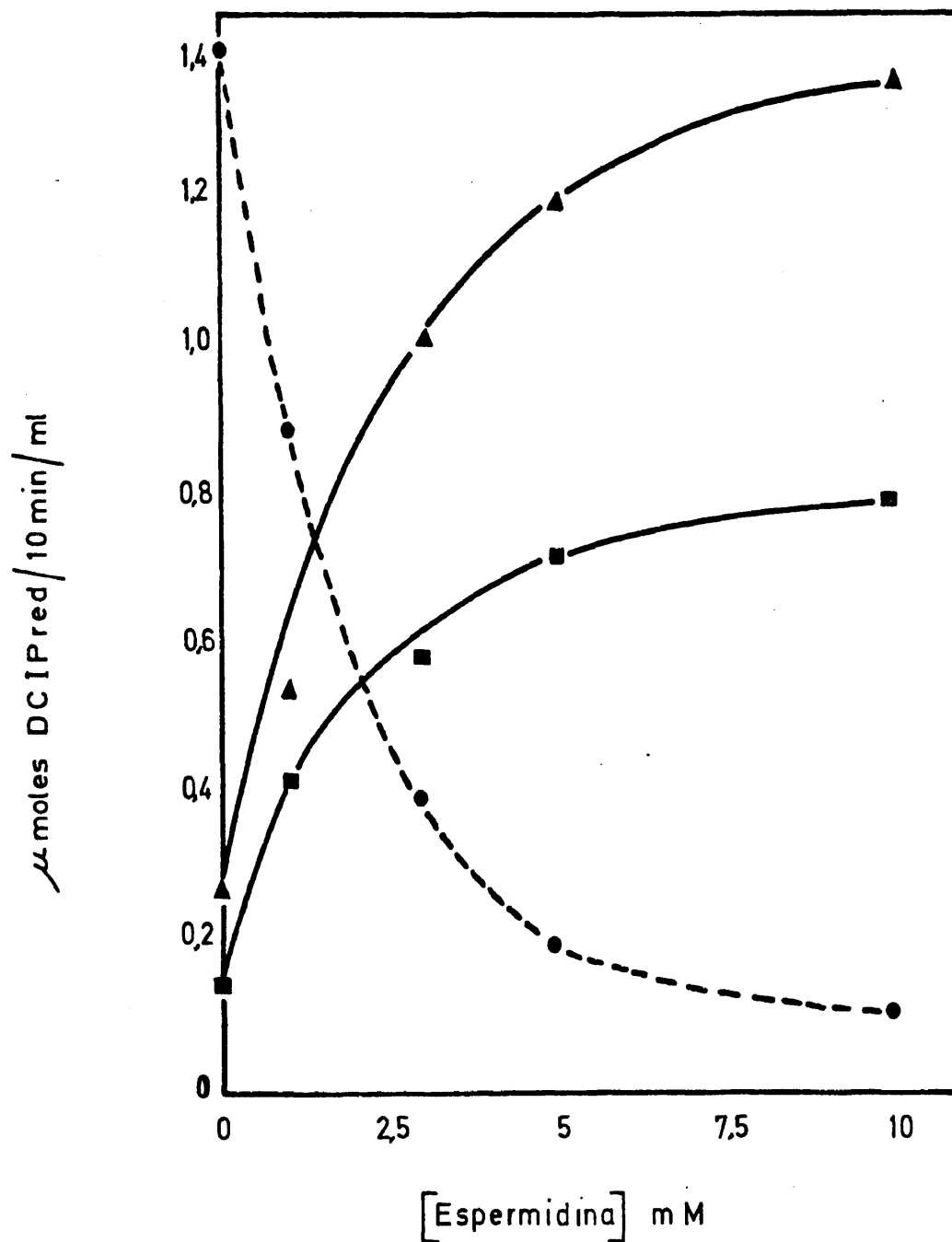


Fig. 11 - Actividad de la NADH-deshidrogenasa en función de la concentración de espermidina en el medio de lisis de los protoplastos. Las condiciones de ensayo se exponen en Materiales y Métodos. La actividad enzimática corresponde a las fracciones siguientes: ●---● NADH -deshidrogenasa soluble con el citoplasma; ▲—▲ enzima ligada a la membrana; ■—■ enzima extraído con EDTA 3 mM.

membrana, hasta tal punto que con una concentración 10 mM la actividad enzimática detectada en el citoplasma sólo responde del 7% de la actividad enzimática total. Por el contrario, el número de unidades enzimáticas medibles en la membrana, muestra un constante incremento, paralelo al incremento de espermidina presente en el medio de lisis del esferoplasto. Este aumento de actividad es más rápido a bajas concentraciones que a altas, quedando siempre una pequeña cantidad de enzima que se solubiliza con el citoplasma. Como en el caso anterior, la actividad extraída con EDTA 3 mM no da cuenta de todas las unidades determinadas en la NADH-deshidrogenasa unida a la membrana, a pesar de que los sedimentos desprovistos de la enzima no manifestaban actividad deshidrogenásica detectable mas que a altas concentraciones de espermidina. Probablemente la concentración de esta poliamina era demasiado alta para ser eliminado todo su efecto por un EDTA 3 mM.

La Fig. 12 expresa la cantidad de proteína total correspondiente a cada una de las fracciones, como efecto de Cl_2Mg , y la Fig. 13 representa el mismo efecto como acción de la espermidina. Estas gráficas están de acuerdo con las de actividad NADH-deshidrogenasa, aun cuando las variaciones en la concentración de la enzima, no deben ser las únicas responsables de las variaciones en la concentración de proteína total. Otras enzimas de membrana, proteínas asociadas a ella, e incluso citoplásmicas, pueden estar afectadas en su unión a la membrana por cationes divalentes y poliaminas.

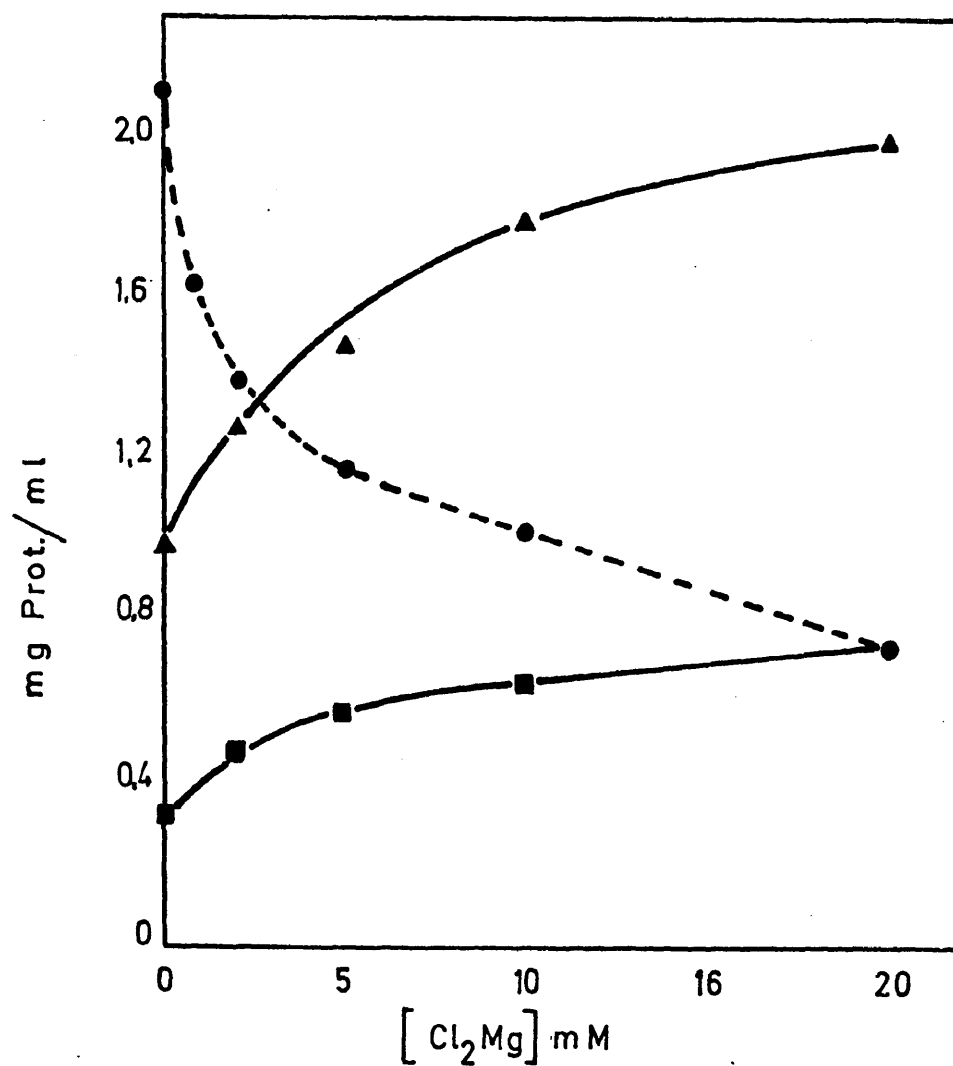


Fig. 12 - Proteínas totales determinadas en las tres fracciones de las Fig. anteriores. ●---● Citoplásmica; ▲—▲ Membrana; ■—■ fracción soluble. Las diferencias de proteína en cada fracción dependen de las concentraciones de magnesio en la preparación de membranas.

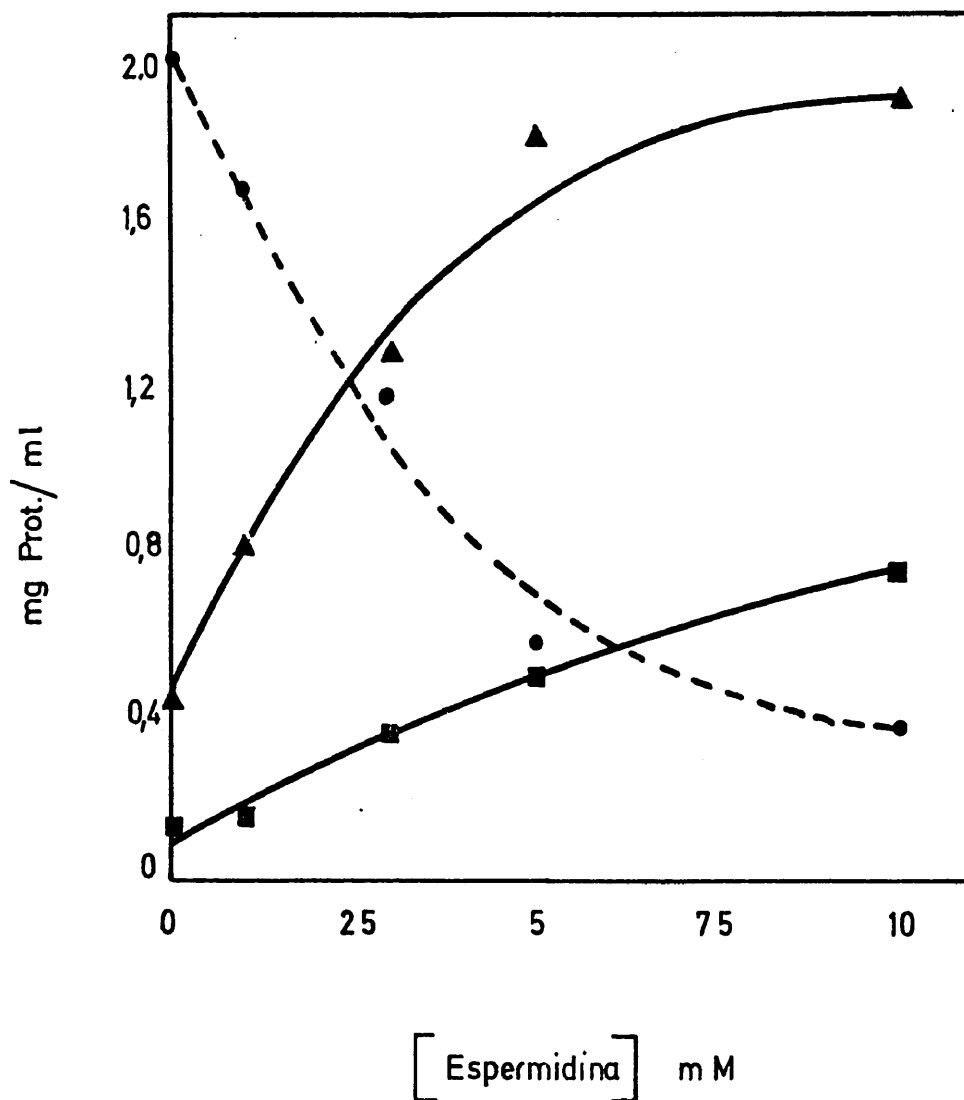


Fig. 13 - Concentración de proteínas en citoplasma, membrana y fracción soluble con EDTA en función de la concentración de espermidina.

●---● Citoplasma; ▲—▲ membrana; ■—■ fracción soluble.

Comparando los resultados obtenidos con el Cl_2Mg y la espermidina observamos una notable semejanza de acción. Ambos agentes determinan, o al menos fortalecen la asociación de la NADH-deshidrogenasa con la membrana bacteriana, pero su capacidad parece distinta. Con el Cl_2Mg no logra superarse un 60% de enzima unida a la membrana, aun a altas concentraciones de magnesio, mientras que la espermidina liga a la membrana bacteriana la casi totalidad de la actividad enzimática del microorganismo. La explicación de esta diferencia puede radicar en el distinto tamaño molecular del Mg^{+2} y la espermidina, o bien en su diverso modo de unión con las proteínas o con los lípidos.

La cantidad intracelular de Mg^{+2} determinada en Micrococcus lysodeikticus (160) rindió una concentración de 20-23 mM. Esta elevada concentración parece indicar la existencia de una bomba para el catión divalente. Hurwitz y col. (161) habían postulado recientemente un proceso semejante en Bacillus cereus. Movidos por estos hechos hemos cultivado nuestro microorganismo en medio de altas concentraciones Mg^{+2} , en la esperanza de que la acumulación del catión dentro de la bacteria supliría de algún modo la necesidad de una adición externa, en el momento de la lisis del protoplasto, impidiendo de este modo la solubilización de la NADH-deshidrogenasa con los integrantes citoplásmicos. Sin embargo, nuestros resultados fueron siempre negativos, con independencia de las concentraciones de Cl_2Mg empleadas. El citoplasma incluía siempre entre sus componentes la enzima en una proporción del 70 al 90% de su actividad.

Como conclusión podemos afirmar que o bien el Mg^{+2} no se acumula en el interior de E.coli, lo que abogaría por la carencia de una bomba de magnesio, o bien se acumula pero por efecto de la dilución permite la disociación de la enzima, o su localización citoplásmica le vuelve ineficaz para proteger la estructura de la membrana cuando el sistema total es distorsionado por la lisis osmótica.

Estabilidad de las preparaciones de ATPasa soluble

Es conocida la inestabilidad de algunas ATPasas al estado soluble, sobre todo a bajas temperaturas. Así, ATPasas mitocondriales de distintos orígenes como pueden ser corazón de buey (162), levadura (163), hígado de rata (164), son muy lábiles cuando se las somete a bajas temperaturas una vez disociadas de la membrana mitocondrial. La ATPasa de cloroplastos (165) pierde hasta un 90% de su actividad original después de una hora a 0 °C. Dentro del campo bacteriano nos encontramos con algo semejante. La ATPasa de Bacillus megaterium pierde entre un 70 y un 87% de actividad cuando se la mantiene durante 24 horas a 4 °C (166, 167).

Sin embargo otras ATPasas son perfectamente estables a bajas temperaturas no solo en forma de extractos crudos sino también cuando han sido purificadas hasta homogeneidad. Fracciones purificadas de ATPasa de Micrococcus lysodeikticus permiten su almacenamiento durante largo tiempo a temperaturas inferiores a 0 °C (138) sin perder nada de su actividad original. De un modo semejan

te se comporta la ATPasa de Streptococcus faecalis. Sin embargo a bajas temperaturas y en presencia de ADP se inactiva con bastante rapidez (168).

Por lo que respecta a la ATPasa de E. coli, su inestabilidad como proteína soluble ha sido ampliamente reseñada (146, 118, 111) y desde este punto de vista presenta una notable semejanza con la mitocondrial.

Con el fin de obtener la máxima información acerca de este problema y poder comparar nuestros resultados con otros ya conocidos, nos hemos propuesto examinar las propiedades de estabilidad de la ATPasa soluble, en especial bajo la forma de extracto crudo. Por descontento que nuestras preparaciones son también inestables, si bien considerablemente menos que las obtenidas por Evans (146) solubilizando la enzima con dodecil sulfato sódico, y tal vez mejores que otras previamente referidas. Hay que notar que la estabilidad de nuestra ATPasa soluble es función de múltiples factores; concentración de proteína, pH, temperatura, etc.

La Tabla VIII muestra la estabilidad de una fracción soluble de ATPasa de E. coli con una concentración de proteína de 37 $\mu\text{g/ml}$. Los pHs extremos han resultado perjudiciales para la estabilidad de la proteína a cualquiera de las tres temperaturas ensayadas; y de éstas la más favorable es la de 24 °C capaz de conservar un 40% de la actividad original después de 144 horas, a pH 7. Hay que

T A B L A VIII

Estabilidad de extractos crudos de ATPasa a distintos pH y temperaturas.

Los extractos fueron preparados como se indica en Materiales y Métodos. La actividad de la enzima está dada en unidades de absorción a 650 nm. Los ensayos fueron efectuados siempre a pH 7.5 La concentración de proteína en estos extractos era de 37 µg/ml Se había diluido siete veces con respecto al extracto original. Aliquotas de estos extractos fueron mantenidas a 4, 24 y 37 °C durante los tiempos que se indican en la Tabla

Tiempo en horas		0	24	48	72	110	144
4 °C	pH 6	1.78	0.98	0.84	0.63	0.51	0.40
	pH 7	1.78	1.54	1.26	0.87	0.62	0.56
	pH 8	1.78	1.54	1.23	0.81	0.57	0.43
	pH 9	1.78	1.40	0.77	0.25	0.12	0.07
24 °C	pH 6	1.78	1.19	0.91	0.69	0.56	0.43
	pH 7	1.78	1.68	1.54	1.08	0.90	0.71
	pH 8	1.78	1.61	1.40	1.05	0.87	0.70
	pH 9	1.78	1.26	0.80	0.41	0.34	0.25
37 °C	pH 6	1.78	0.73	0.46	0.41	0.32	0.25
	pH 7	1.78	1.33	0.66	0.47	0.36	0.27
	pH 8	1.78	0.84	0.57	0.45	0.29	0.23
	pH 9	1.78	0.51	0.42	0.24	0.22	0.14

notar la pérdida de actividad a 37 °C, muy superior de la de 4 °C. Esta aparente labilidad a 37 °C puede muy bien no ser el reflejo de la inestabilidad de la proteína a esa temperatura, como apuntaremos a continuación, sin embargo es un hecho comprobado que por encima de 35 °C la ATPasa soluble se hace sensible al calor advirtiéndose una rápida pérdida de actividad en función del tiempo de exposición. De este aspecto trataremos más adelante.

En la Tabla IX se describe un experimento idéntico al anterior, salvo en la concentración de proteína. Las muestras empleadas para obtener los datos presentes tenían una concentración de proteína total solubilizada de 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Al igual que antes nos encontramos con que los pHs extremos favorecen la inactivación de la enzima pero de una forma todavía más acusada. Después de 24 horas a pH 6 en el mejor de los casos, sólo se conserva el 36% de la actividad, en tan que a pH 9 se alcanza ese porcentaje al cabo de 72 horas. En cualquier caso la pérdida de actividad a esos pHs es muy elevada. Si nos referimos a las temperaturas, nuevamente volvemos a encontrar que la de 24 °C es la mejor de las estudiadas, con un 29% de actividad después de 168 horas a pH 7. Estas condiciones contrastan con la drástica desaparición de actividad cuando las muestras se mantienen a 37 °C.

A la vista de estos resultados se pueden sacar algunas conclusiones: a.- La ATPasa soluble de E.coli es muy inestable a pHs extremos, encontrando su óptimo probablemente a pH neutro o ligera-

mente superior. b.- Su labilidad a bajas temperaturas es menos extrema de lo que cabría esperar a partir de la literatura precedente.

c.- La concentración de proteína parece estar implicada de alguna manera en el mantenimiento de la estabilidad, al menos a la temperatura de 37 °C. No se advierte una diferencia notable a otras temperaturas, aunque una dilución mayor parece favorecer una mejor conservación de la actividad enzimática.

Ya hemos apuntado que la ATPasa soluble de E.coli pierde actividad cuando es expuesta a temperaturas superiores a 35 °C durante tiempos no muy cortos, y que esta podía ser la razón de su comportamiento a 37 °C en las dos experiencias que ahora estamos considerando. No obstante, esta interpretación no da razón de la drástica caída de actividad cuando la concentración de proteína es mayor. Probablemente interviene otro factor dependiente de la concentración, como puede ser la presencia de una proteasa cuya acción se manifiesta sólo a esta temperatura y es mas eficaz cuanto mayor sea la concentración de proteína total.

De acuerdo con los resultados de algunos investigadores (118, 111) el glicerol es un agente capaz de conferir cierta estabilidad a la ATPasa soluble. Sin negar esos resultados nosotros no podemos corroborar con nuestras experiencias la ventajosa utilización de este alcohol a tal fin.

T A B L A IX

Estabilidad de extractos crudos de ATPasa en función de la temperatura y pH.

La actividad está expresada en unidades de absorción a 650 nm.

La concentración de proteína en estos extractos era de 230 μ g/ml.

Todas las determinaciones de actividad se efectuaron a pH 7.5

Tiempo en horas	0	24	48	72	96	168
4 $^{\circ}$ C pH 6	1.35	0.49	0.35	0.19	0.09	0.03
pH 7	1.35	1.13	1.04	0.89	0.70	0.29
pH 8	1.35	1.20	1.03	0.84	0.64	0.24
pH 9	1.35	1.20	1.03	0.84	0.64	0.24
24 $^{\circ}$ C pH 6	1.35	0.30	0.18	0.14	0.08	0.02
pH 7	1.35	1.28	1.16	1.11	0.88	0.40
pH 8	1.35	1.24	1.16	1.01	0.69	0.27
pH 9	1.35	1.14	0.96	0.45	0.09	0.01
37 $^{\circ}$ C pH 6	1.35	0.14	0.08	0.00	0.00	0.00
pH 7	1.35	0.92	0.03	0.00	0.00	0.00
pH 8	1.35	1.08	0.06	0.00	0.00	0.00
pH 9	1.35	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00

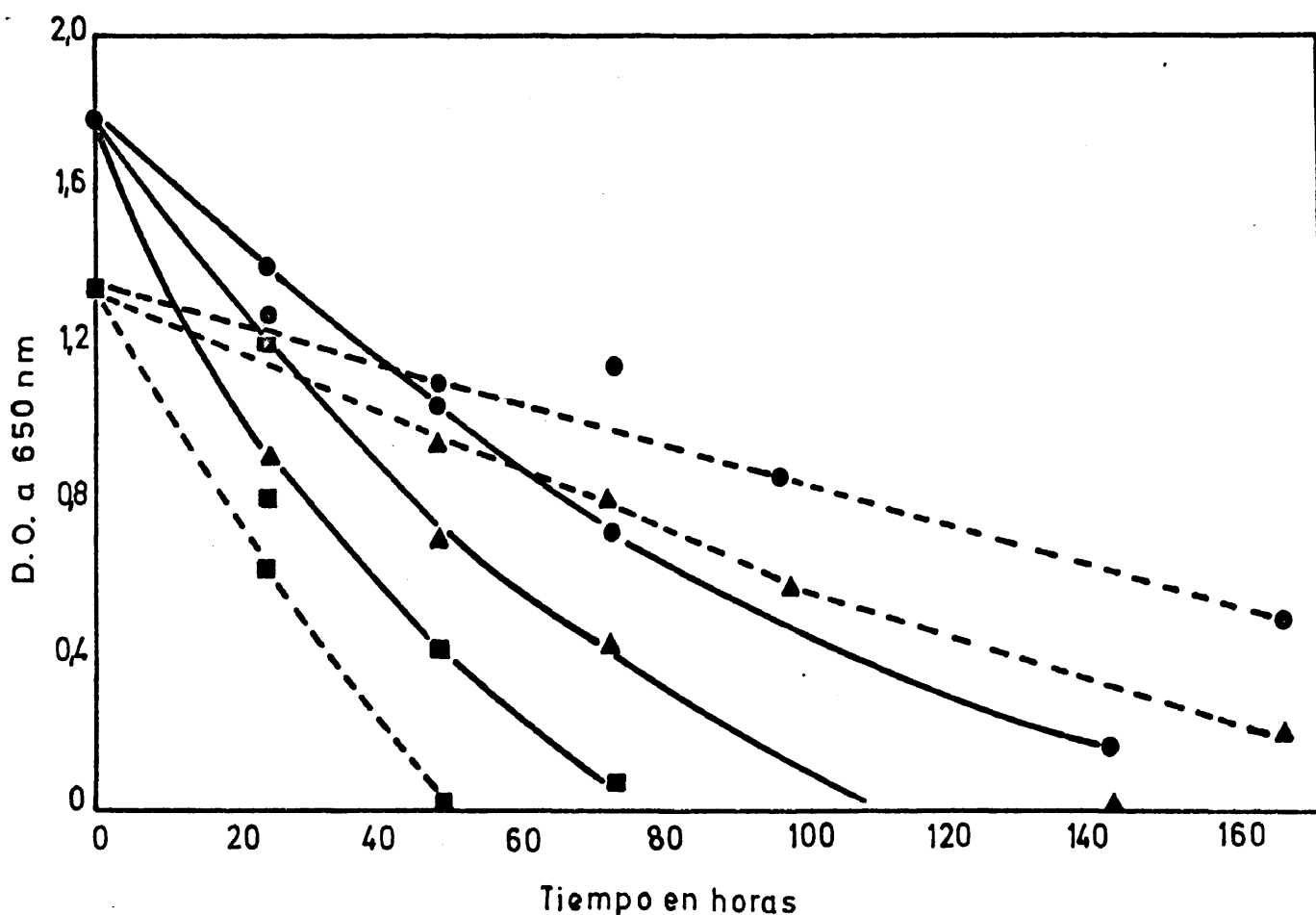


Fig. 14 - Efecto del glicerol en la estabilidad de la ATPasa soluble de *E. coli*. Se prepararon tres fracciones de extracto crudo de ATPasa con glicerol al 10% y una concentración de proteína de $37 \mu\text{g/ml}$, y se mantuvieron durante los días que duró el ensayo a las temperaturas siguientes: ●—● 4°C ; ▲—▲ 24°C ; ■—■ 37°C . Otros tres lotes se prepararon en las mismas condiciones a excepción de la concentración de proteína que era de $230 \mu\text{g/ml}$. Las temperaturas fueron: ●---● 4°C ; ▲---▲ 24°C ; ■---■ 37°C . La actividad viene dada en unidades de absorción a 650 nm.

En la Fig. 14 presentamos el efecto del glicerol al 10% en dos tipos de fracción soluble que sólo se diferencian en la concentración de proteína. Alícuotas de cada fracción se han mantenido a 4, 24 y 37 °C durante los tiempos indicados. Es inmediato ver que a más baja temperatura hay una mayor estabilidad y que ésta vendrá favorecida por la concentración de proteína, alcanzándose un 36% de conservación de actividad después de 168 horas de exposición de la fracción a 4 °C en glicerol al 10%. Cuando la concentración de proteína es menor la estabilidad es también menor para cualquiera de las temperaturas. Una vez más a 37 °C nos encontramos con una rápida pérdida de actividad que va en el mismo sentido que la de las Tablas anteriores.

Es indudable que el glicerol a bajas temperaturas ejerce un efecto protector sobre la actividad de la ATPasa soluble, pero este efecto no es superior al logrado en ausencia de glicerol con sólo conservar la enzima a una temperatura de 24 °C.

Evans (146) ha empleado el dodecanotiol como un posible estabilizante de la ATPasa soluble con resultados positivos aunque cuantitativamente parciales. La aplicación de esta técnica a nuestra fracción soluble (fig. 15) fué también positiva, pero en modo alguno definitiva. Una vez más el pH y la concentración de proteína desempeñan algún papel. A pH 7.5 y concentración de proteína de 240 μ g/ml nos encontramos con un 32% de la actividad original después de 168 horas a temperatura ambiente. Los resultados a más baja concen

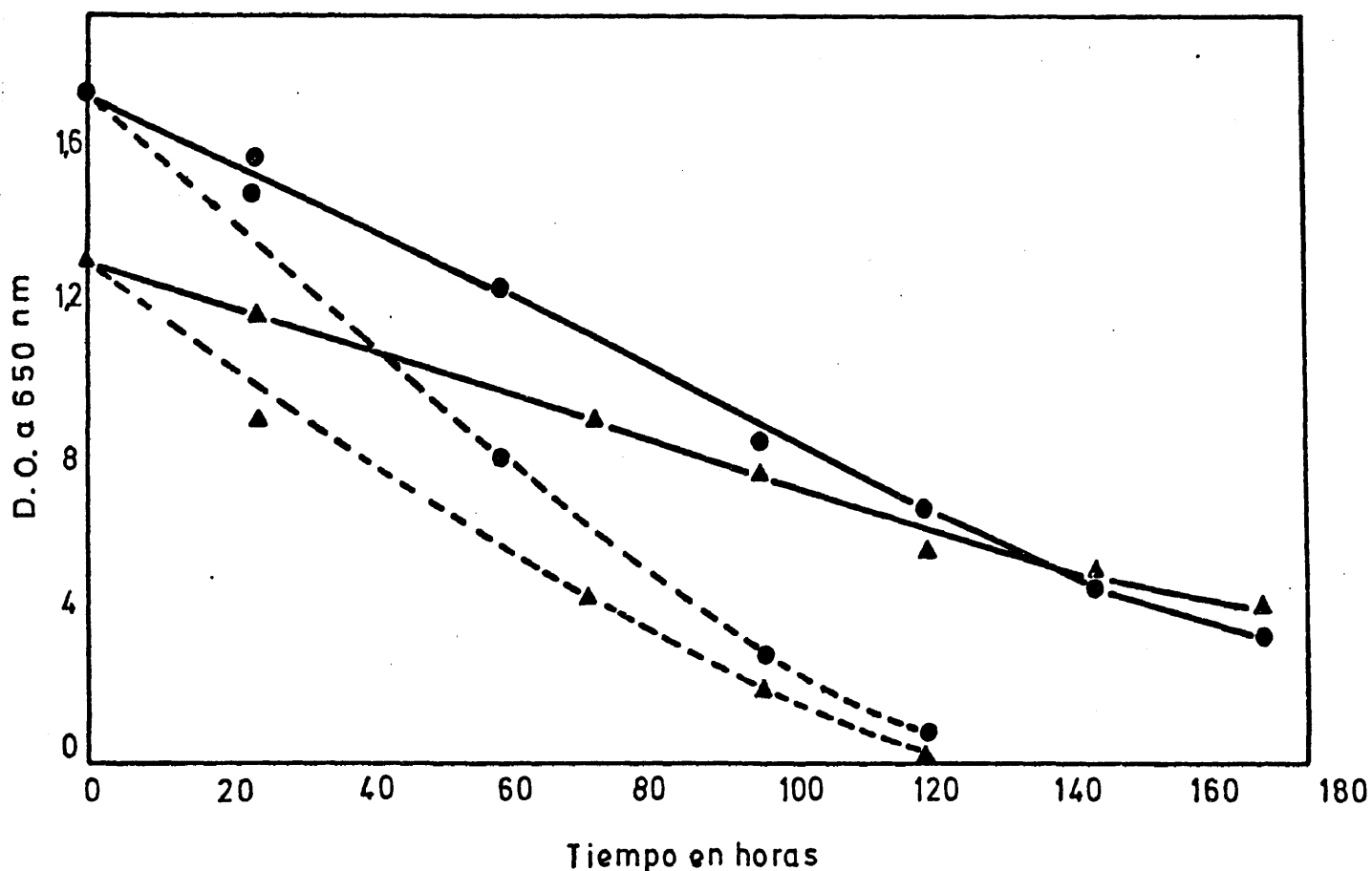


Fig. 15 - Efecto del dodecanol sobre la estabilidad de la ATPasa soluble de E.coli. Los extractos crudos fueron obtenidos con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. Las fracciones ▲—▲ y ▲---▲ con 120 μg Prot/ml y las ●—● y ●---● con 240 μg Prot/ml, fueron preparadas como se indica en Materiales y Métodos y conservadas a temperatura ambiente durante el tiempo que duró la experiencia. Las fracciones expresadas en trazo continuo estuvieron a pH 7.5, y las de trazo discontinuo a pH 9. Las actividades fueron determinadas a los tiempos que se indican en abscisas y vienen dadas en unidades de absorción óptica medida a 650 nm.

tración de proteína son semejantes a los obtenidos a la misma temperatura y pH en ausencia de dodecanotiol. En suma, ni el glicerol ni el dodecanotiol pueden catalogarse como sustancias definitivamente estabilizantes de la ATPasa soluble de E.coli.

La inactivación de la ATPasa en su forma soluble, a lo largo del tiempo, está implicada en factores de diversa índole como temperatura, pH, concentración de proteína, presencia de alcoholes, tioles, etc. Si prescindimos de la posible proteólisis que tendría lugar a elevadas temperaturas (37 °C) y más intensamente a mayor concentración de proteína, probablemente solo un tipo de mecanismo es el responsable de la pérdida de actividad de la enzima. La disociación de la proteína nativa para dar lugar a componentes de menor peso molecular parece el mecanismo más indicado. De acuerdo con esta interpretación estaría el hecho de que, en general, a bajas temperaturas es menos estable la ATPasa que se encuentra en fracciones más diluidas, puesto que a mayor dilución se debe desplazar el equilibrio en el sentido de una mayor disgregación. Por el contrario, el incremento de concentración está favoreciendo la permanencia de la proteína formando un todo, y así parece desprenderse de los resultados anteriores. En consecuencia, creemos que existe un mecanismo fundamental de inestabilidad, que es la disociación de la ATPasa en sus componentes menores y otro que ocurriría a 37 °C y que puede admitirse como un fenómeno proteolítico o más probablemente como el

mismo proceso disociativo incrementado como efecto termodinamicamente lógico del aumento de temperatura.

Esta interpretación viene ampliamente corroborada por los resultados de la Fig. 16. En ella se presenta un estudio comparativo de pérdida de actividad determinada en geles de poliacrilamida, en relación con alteraciones en la cantidad de proteína de cada banda, como efecto de la caída de actividad. Los resultados fueron obtenidos con extractos crudos, a una concentración de proteína de 240 $\mu\text{g/ml}$, mantenidos a temperatura ambiente y pH 7.5 durante los siete días en que se realizaron los ensayos. Como una función del tiempo (cada par de geles tiene al menos dos días más que el anterior) la primera banda de ATPasa, indicada con el número 2, va disminuyendo como proteína y como actividad enzimática. En respuesta a esa disminución se nota un incremento en la banda 3 que también se tiñe para actividad y en la banda 5 que no da actividad. Después de suficiente tiempo, prácticamente toda la ATPasa se encuentra bajo la forma de la banda más rápida (5) indicando una total disociación de la proteína en sus componentes menores.

Por último se efectuó un estudio similar al anterior con ATPasa purificada por Sephadex G-200. Los resultados se encuentran en la Fig. 17 y son una confirmación de todo lo expuesto sobre estabilidad del enzima.

La ATPasa purificada fué conservada a temperatura ambiente, pH 7.5, durante los once días que duraron las experiencias.

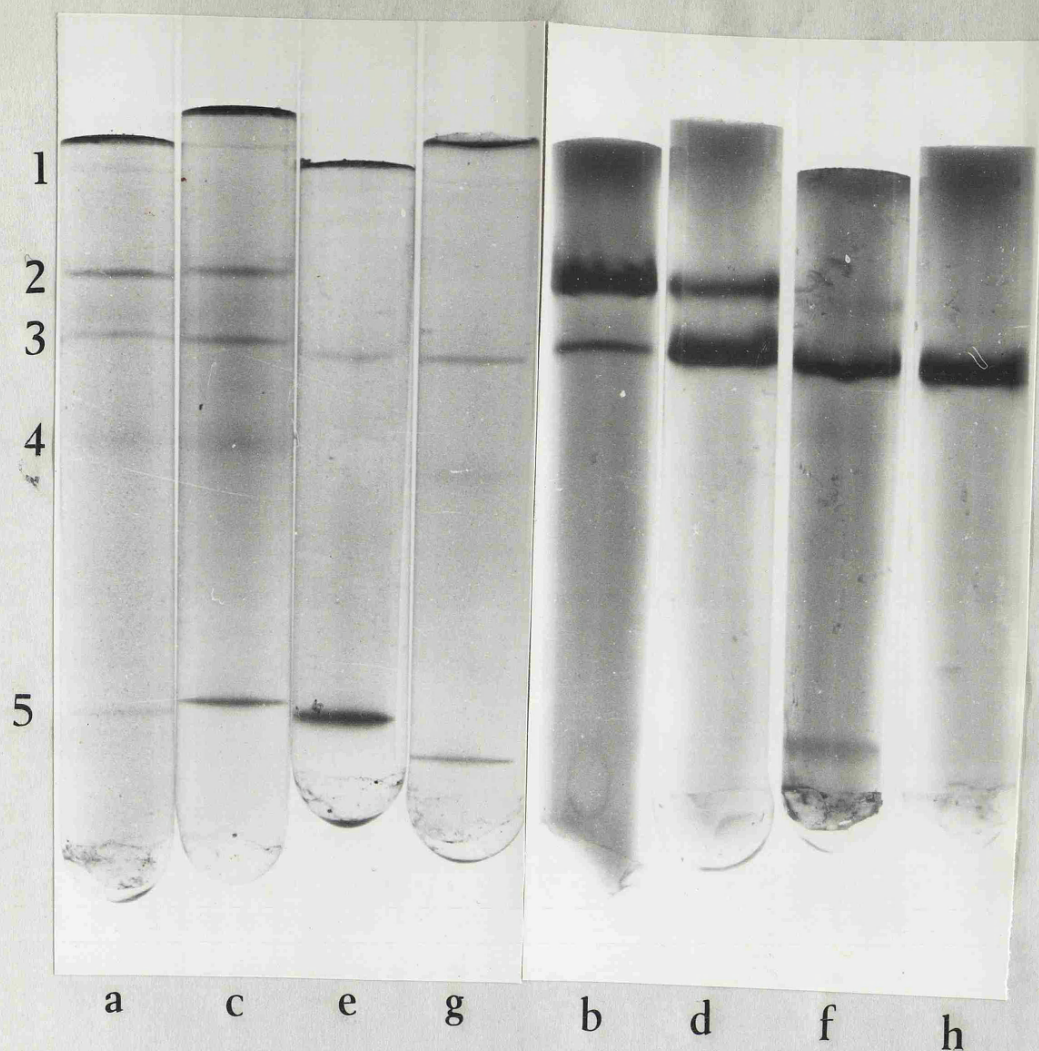


Fig. 16 - Geles de poliacrilamida al 7% para proteínas y actividad enzimática de ATPasa soluble. El extracto crudo fué obtenido con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. El extracto fué conservado a pH 7.5 y temperatura ambiente durante los diefe días que duraron las experiencias. Cada gel tiene unos 40 g de proteína total. Los geles a, c, e, g, están teñidos para proteínas y los b, d, f, h para actividad enzimática. El par a b fué corrido el día de la solubilización, el c d dos días después, el e f cuatro y el g h 7 días después de la extracción. Las - bandas detectables para proteína van numeradas del 1 al 5.

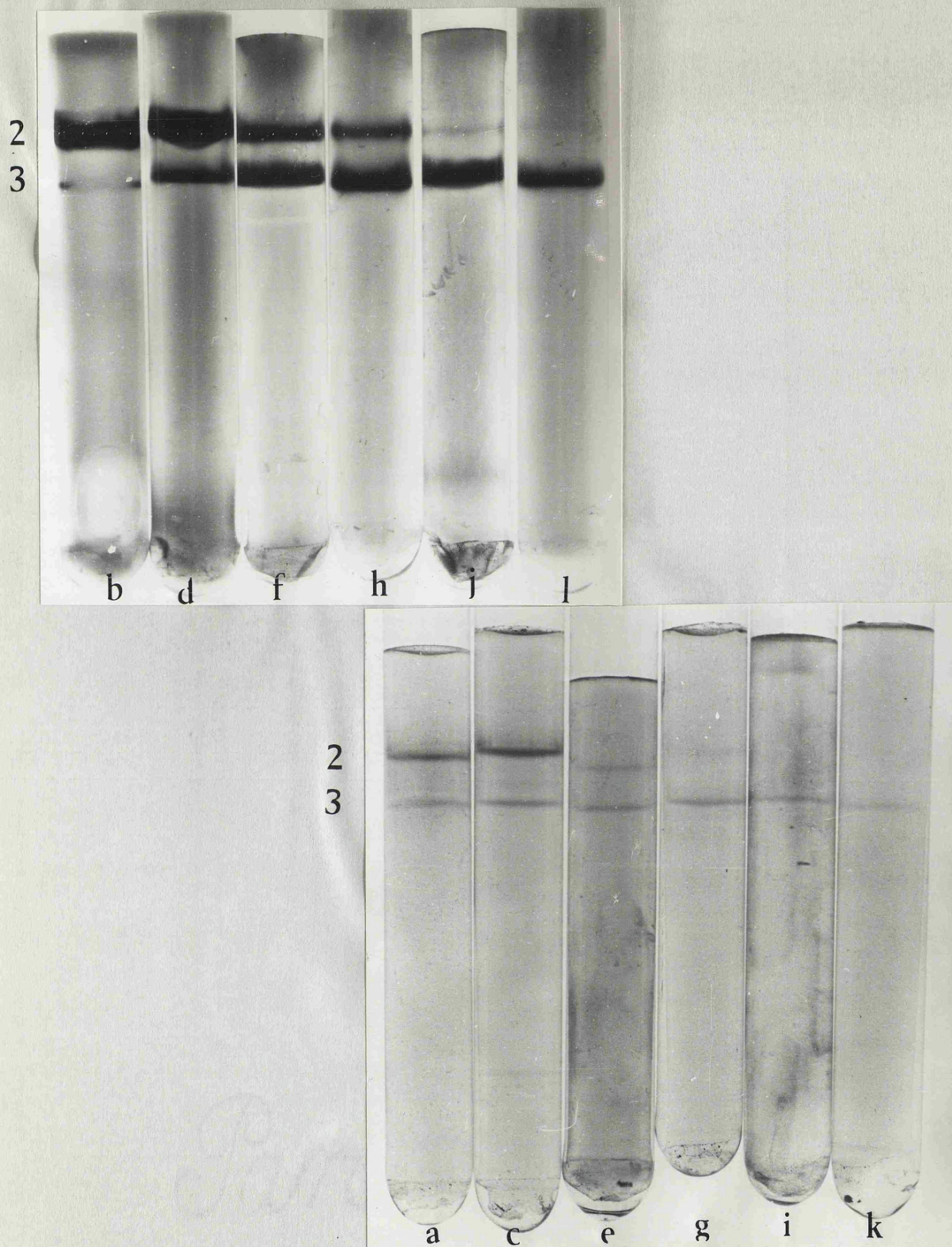


Fig. 17 - Geles de ATPasa purificada en columna de Sephadex G-200. Cada gel contiene $25 \mu\text{g}$ de proteína. Los geles a, c, e, g, i, k, se tiñeron para proteína y los b, d, f, h, j, l, para actividad enzimática. El par a.b fué corrido el día de la elución y los siguientes 2, 4, 6, 8 y 11 días más tarde respectivamente. La proteína se mantuvo a temperatura ambiente.

Cada par de geles teñido para proteína y actividad fué corrido en idénticas condiciones, y a excepción del último, con dos días de diferencia del anterior. Fuera de las dos bandas de ATPasa, que seguiremos denominando como banda 2 y 3, no se advierte ninguna banda de proteína. Es de notar la gradual desaparición de la banda más lenta y el paralelo reforzamiento de la segunda, de modo especial en su actividad, ya que como proteína no es igualmente detectable. Geles con mayor cantidad de proteína que estos permiten visualizar la banda más rápida, número 5, que observamos con los extractos crudos y aun bandas intermedias más tenues. Todo esto explica el que no podamos ver en estos geles un notable incremento en proteína de la segunda banda de ATPasa, puesto que ella a su vez se está transformando en componentes de mayor movilidad.

Como conclusión de estos estudios de estabilidad, creemos podemos afirmar, al menos como hipótesis de trabajo, que la banda número 2 representa en cualquier caso la ATPasa nativa, única que tiene actividad enzimática detectable en tubo; que la banda 3 es un producto de transformación de la 2, capaz de una hidrólisis muy lenta ó quizás solo de fijar ATP. El mecanismo de transformación de la 2 en la 3 nos es desconocido, pero puede suponerse debido a un cambio conformacional que confiere a la enzima mayor movilidad sin alterar su peso molecular.

La banda número 5 representaría el componente menor disociado de la proteína nativa, absolutamente sin actividad. Las bandas

intermedias que se observan en geles de preparaciones purificadas con mayor cantidad de proteína representarían estados intermedios de disociación, muy inestables o quizás componentes minoritarios de la ATPasa no disociables en ulteriores subunidades.

Purificación parcial de la ATPasa soluble y caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Con objeto de obviar las dificultades procedentes de solubilizar la ATPasa de E.coli con $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ como tampón de extracción, sustituimos esta sal amónica por Tris de igual concentración. Con ello eliminamos la activación debida al ión CO_3H^- . Por consiguiente, en adelante toda fracción soluble será obtenida por lavado de las membranas con EDTA 3 mM en Tris 50 mM pH 9.

La purificación de la ATPasa de E.coli fué abordada a partir de fracciones solubles con EDTA. Estas fracciones eran obtenidas como sobrenadante de $37.000 \times g$; razón por la que cabía la dificultad de que la enzima no se hallase en forma soluble sino formando grandes agregados con proteínas y lípidos de membrana de aspecto vesicular. Sin embargo no era así. Cuando la ATPasa soluble de $37.000 \times g$ se centrifugaba a $125000 \times g$ durante 30 min. daba un sobrenadante totalmente transparente y que contenía toda la actividad ATPásica, y un sedimento que comprendía lípidos y aproximadamente la cuarta parte de la proteína total solubilizada con EDTA. Este criterio nos daba cierta seguridad de que estábamos trabajando con una proteína al estado soluble.

El sobrenadante de 125000 x g se concentraba con membrana Diallo de Amicon XM-50, al mismo tiempo que se cambiaba el pH a 7.5, hasta un volumen de 4 ml y una concentración de proteína de 5 mg/ml, variando algo estas condiciones de una preparación a otra. Este concentrado de fracción soluble se aplicaba a una columna de Sephadex G-200 y se eluía en el mismo tampón de extracción, pero a pH 7.5. El perfil de elución para proteínas y actividad enzimática, con y sin tripsina en el medio de ensayo, se presenta en la Fig. 18. Inmediatamente después del volumen de exclusión (132 ml) sale un pico de proteínas de alto peso molecular o más probablemente formando agregados en forma de pequeñas vesículas. La ATPasa, con un volumen de elución de 180 ml, sale a continuación, correspondiendo su pico de actividad con una notable absorción a 230 nm. Sin embargo la distribución de la proteína que acompaña a la actividad, no presenta unos máximos y mínimos que puedan considerarse como el reflejo de una proteína homogénea en su estructura molecular o en su actividad enzimática. Al final, con el volumen de inclusión aparece un ancho pico que absorbe 260 nm y menos a 230 nm, claro indicio de la presencia de nucleótidos en la muestra. Este paso por columna de Sephadex nos ha permitido una purificación aparente de la ATPasa de unas 7 veces, si bien creemos que la purificación real ha sido bastante superior, como se puede deducir del estudio de su estabilidad (ver anteriormente).

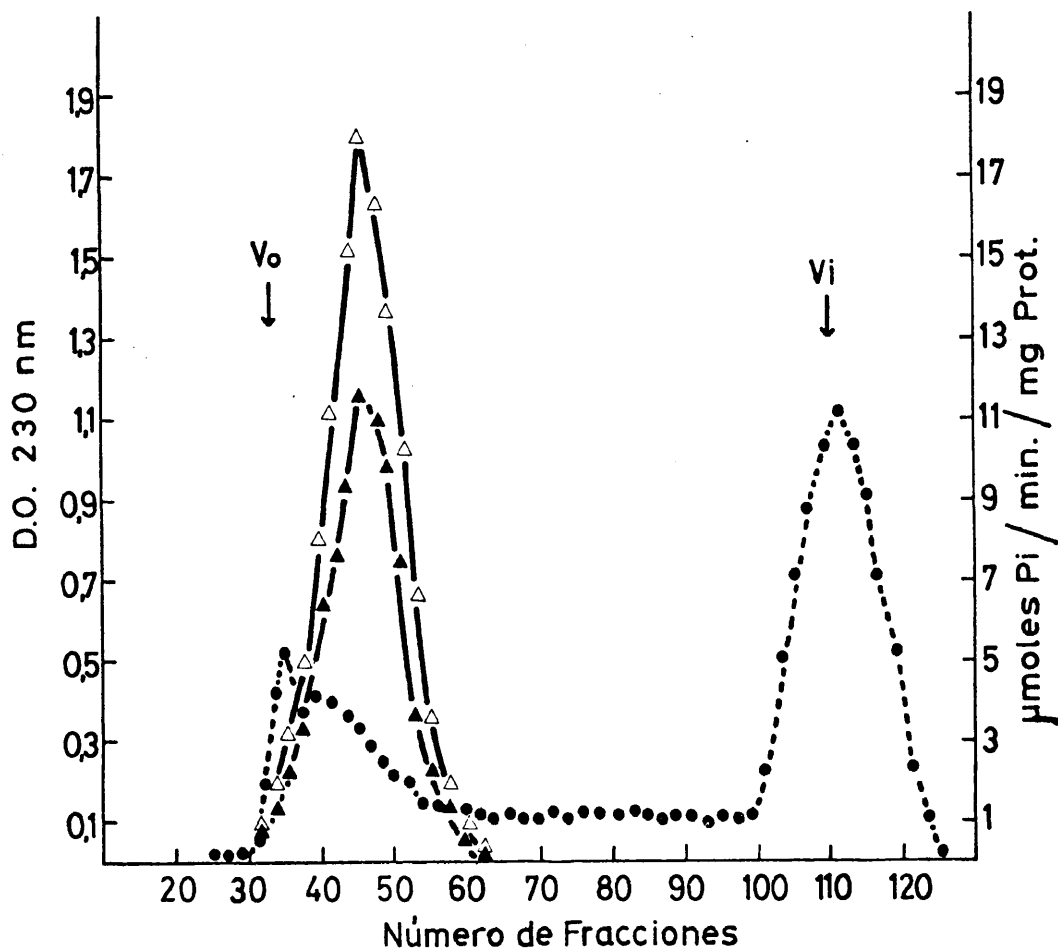


Fig. 18 - Filtración de ATPasa soluble de E. coli por Sephadex G-200. La fracción soluble fué obtenida con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. 120 ml de esta fracción se concentraron a 5 ml por ultrafiltración con filtro Diaflo XM-50. Estos 5 ml con una concentración de proteína de 4 mg/ml. fué introducido en una columna de las características descritas en Materiales y Métodos y las fracciones de 4 ml recogidas en un colector Bekman modelo 133 A y ensayadas para proteínas ●---●; ATPasa en presencia de tripsina Δ---Δ; y ATPasa en ausencia de tripsina ▲—▲.

Las fracciones 37-53 que tienen la máxima actividad eluida de la columna de Sephadex se han concentrado con membrana Diaflo de Amicon XM-50 y se han pasado por una columna de Sepharosa 4B equilibrada con el mismo tampón y de las características que se indican en Materiales y Métodos. Los resultados de la Fig. 19 de muestran que hay un máximo de proteína que coincide con el máximo de actividad enzimática, y que la enzima aparece purificada unas 16 veces, si hemos de fijarnos en su actividad medida después de la elución.

El comportamiento de la ATPasa a través del Sephadex G-200 nos suministra algunos parámetros de utilidad para el conocimiento de la proteína. El volumen relativo de elución $V_e/V_o = 1,30$ y el coeficiente de partición $K_d = 0,12$ son una buena confirmación del estado soluble de la ATPasa y nos permiten determinar un peso molecular aproximado de 300000 o ligeramente superior, calculado de acuerdo con la relación experimental de Determann y col. (169). Pesos moleculares de $350\,000 \pm 30\,000$ (118) y 400 000 (111) ya han sido propuestos para otras ATPasas solubles de E.coli. Evans (146) ha sugerido un peso molecular de 100 000 para ATPasa de E.coli solubilizada con dodecil sulfato sódico. Este peso molecular tan bajo es probablemente una consecuencia del poder disociativo del detergente empleado en la solubilización. Un peso molecular comprendido entre 300 000 y 350 000 está de acuerdo con los pesos moleculares de otras ATPasas de distintos organismos (170, 171, 172).

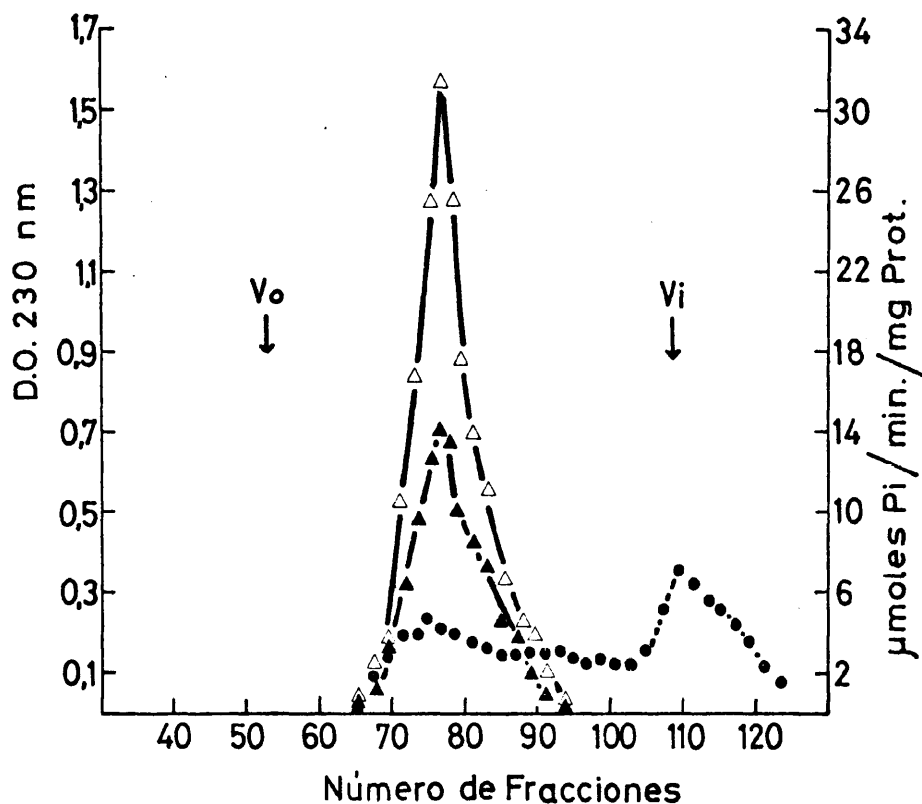


Fig. 19 - Perfil de elución de ATPasa a través de columna de Sepharosa 4 B de características descritas en Materiales y Métodos. La columna fué cargada con 3,6 mg de ATPasa purificada en Sephadex G-200 concentrada con membrana Diaflo XM-50 en 2 ml de tampon. Se recogieron fracciones de 3,7 ml y se ensayaron para proteína ●---● y ATPasa: Δ — Δ con tripsina; ▲ — ▲ sin tripsina.

Análisis electroforético de la ATPasa

El estudio electroforético de los distintos estados en que se encuentra la enzima (extracto crudo, eluido de Sephadex, eluido de Sepharosa) presenta serias dificultades como consecuencia de la gran inestabilidad de la enzima una vez dissociada de la membrana. Electroforesis en gel del extracto crudo mostró 5 o 6 bandas de proteína, aparte de cierta cantidad de material protéico que permanece retenida en la cima del gel. Cuando el gel se carga con grandes cantidades de proteína (150-200 g) aparecen otras bandas como constituyentes de la fracción soluble de la ATPasa. De todas estas bandas solo las marcadas con los números 2 y 3 de la Fig. 20, corresponden a ATPasa, como lo demuestra la tinción de actividad en geles corridos simultáneamente para actividad y proteína. En cualquier caso la misma banda de ATPasa aparece como el componente mayoritario de las proteínas presentes en el gel, lo que es indicativo de una solubilización realmente selectiva de la ATPasa. La movilidad de esta banda, es semejante a la movilidad de la ATPasa de Micrococcus lysodeikticus (171) y una vez más confirma el caracter soluble de la enzima.

El análisis de fracción purificada tanto por cromatografía en Sephadex G-200 como en Sepharosa 4B, da en todos los casos dos bandas netas, como se ve en la Fig. 20, b. Cantidades grandes de proteína en el gel pueden dar lugar a la aparición de agregados de elevado peso molecular y bandas de movilidad más rápida que la

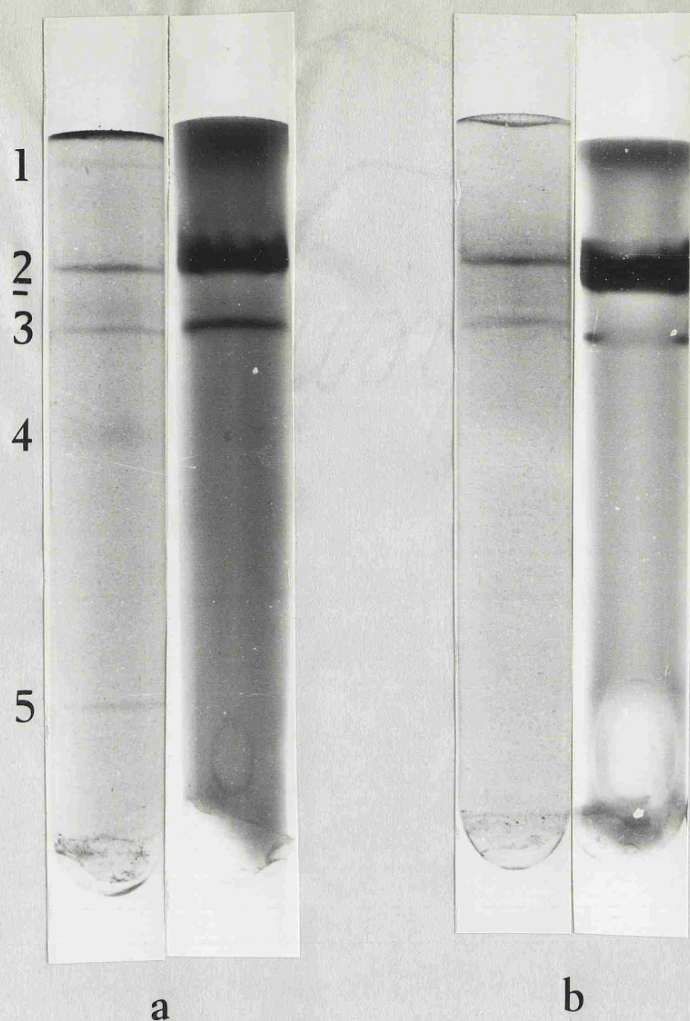


Fig. 20 - Electroforesis en geles de poliacrilamida de ATPasa de E.coli.
a fracción soluble con EDTA 3 mM en Tris 50 mM pH 9, y b fracción
purificada en Sephadex G-200. En ambas fracciones el gel de la izquierda
está teñido para proteínas y el de la derecha para actividad enzimática. -
Las bandas de proteína están enumeradas de menor a mayor movilidad.

enzima activa, en especial si se trata de ATPasa que ha pasado largo tiempo al estado soluble. Creemos que la primera banda corresponde a la enzima nativa puesto que es como proteína la más importante y cinéticamente la más activa, en tanto que la segunda aparece como el resultado de una transformación de la primera. El análisis de actividad enzimática representado en el gel de la derecha de la misma figura manifiesta una gran actividad para la primera banda, pero muy escasa para la segunda. De hecho extractos crudos recién preparados muestran una notable preponderancia de la primera banda sobre la segunda; situación que llega a invertirse con el transcurso del tiempo. Una situación totalmente semejante acontece con las fracciones purificadas tanto por lo que respecta a la actividad enzimática como a la cantidad de proteína.

De acuerdo con los criterios de purificación de enzimas, creemos que la ATPasa de E.coli K 12 ha sido purificada. El enriquecimiento de 16 veces no es más que aparente. La purificación real se manifiesta muy superior. La causa de esta discrepancia radica en la inestabilidad de la enzima una vez dissociada de la membrana bacteriana. Manipulaciones posteriores con la fracción soluble y purificada encaminadas a estabilizar la proteína, rindieron cotas de purificación superiores a 30 veces. Estos resultados guardan una perfecta relación con las pequeñas mejoras logradas en la estabilidad de la enzima. En consecuencia podemos afirmar que la actividad específica de la enzima purificada, refleja solo la actividad de una parte de esa en-

zima que todavía se mantiene como proteína cinéticamente nativa, mientras que otra parte de ella determinable como proteína ya ha perdido su capacidad hidrolítica. De hecho, cuando prácticamente toda la enzima se ha reducido a la segunda banda, la actividad enzimática en tubo es difícilmente detectable. Ignoramos si la actividad mostrada en geles por la segunda banda de ATPasa es expresión de una verdadera hidrólisis o más bien es el resultado de fijación de sustrato durante el tiempo de reacción. La evidencia de que la ATPasa arrastre consigo nucleótidos ligados ya ha sido presentada en otros organismos y no puede ser excluida a priori en nuestro sistema.

Cinética de la ATPasa de E.coli

Ya conocemos algunas características de la ATPasa de E.coli: Su estimulación por tripsina, su estabilidad en la forma soluble, ciertos aspectos moleculares, condiciones óptimas de solubilización y otras. Basados en la interesante función que la ATPasa debe desempeñar en el microorganismo vivo, como puede ser síntesis de ATP en aerobiosis, fenómeno de transporte, procesos que utilizan energía, por una parte, y en el comportamiento diferencial de la enzima cuando se encuentra unida a la membrana y cuando se ha extraído de ella, por otra, nos hemos interesado por su comportamiento cinético. La cinética de la ATPasa ha sido estudiada en sus dos formas ya conocidas: ATPasa unida a la membrana y ATPasa soluble con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. Debido a

su notable inestabilidad no se ha estudiado la cinética de la proteína purificada ya que requeriría purificar enzima para cada experiencia particular. Por esta misma razón, todos los ensayos que se han hecho con la fracción soluble han tenido lugar dentro de un tiempo inferior a una hora, a partir del momento en que se preparó la enzima soluble, y durante este corto tiempo la ATPasa se ha mantenido en las condiciones óptimas de estabilidad que hasta ahora conocemos. Con esto creemos haber estudiado la ATPasa soluble en su mejor estado de actividad enzimática.

La determinación de la actividad ATPásica en los estudios de cinética se efectuó tal como se describe en Materiales y Métodos, teniendo presente la necesidad de precisar en cada caso el tiempo requerido para medir velocidades iniciales.

Con objeto de llegar a comprender el mecanismo de acción de la tripsina hemos efectuado todas las experiencias en presencia y en ausencia de la proteasa, tanto de la ATPasa ligada a la membrana como de la enzima en su estado soluble.

Salvo casos muy raros que se advertirán oportunamente, la actividad de la ATPasa vendrá dada como actividad específica en $\mu\text{moles de Pi liberado/minuto/mg de proteína}$.

Efecto de la concentración de ATPasa en la velocidad de reacción

Se admite como principio general que doble número de moléculas de una enzima transformarán un número doble de moléculas de sustrato (173). Es decir que la velocidad de reacción en función de

la concentración de enzima es perfectamente lineal. Y si bien este es el caso más común, existen múltiples causas que impiden esta linealidad, originando curvas de muy diversos tipos. La Fig. 21 muestra el efecto de la concentración de ATPasa unida a la membrana de E.coli sobre la actividad enzimática. En cualquiera de los casos, (ausencia de tripsina, presencia de tripsina en concentración constante o en concentración creciente a partir de una dada cantidad de proteína) observamos linealidad solo a bajas concentraciones de enzima. Entre 100 y 150 μ g de proteína de membrana las gráficas comienzan a doblarse hacia abajo indicando una reducción notable de la ATPasa en su capacidad hidrolítica. Esta disminución es muy apreciable en actividades ensayadas en ausencia de tripsina, quizás un poco menos a concentración constante de tripsina, y claramente paliada cuando la concentración de proteasa se incrementa paralelamente a la de proteína de membrana.

Estos resultados admiten interpretaciones desde distintos puntos de vista, aunque con diversos grados de verisimilitud.

La posibilidad de que nuestro método de ensayo de actividad no sea válido a altas concentraciones de enzima, no parece probable. Si bien es cierto que todo método colorimétrico pierde sensibilidad a altas concentraciones del colorante, no lo es menos que nosotros hemos operado a tiempos suficientemente cortos, no sólo con el fin de medir velocidades iniciales sino también con el propósito de evitar complejos fosfomolibdicos de alta densidad óptica. Esta posible interpretación

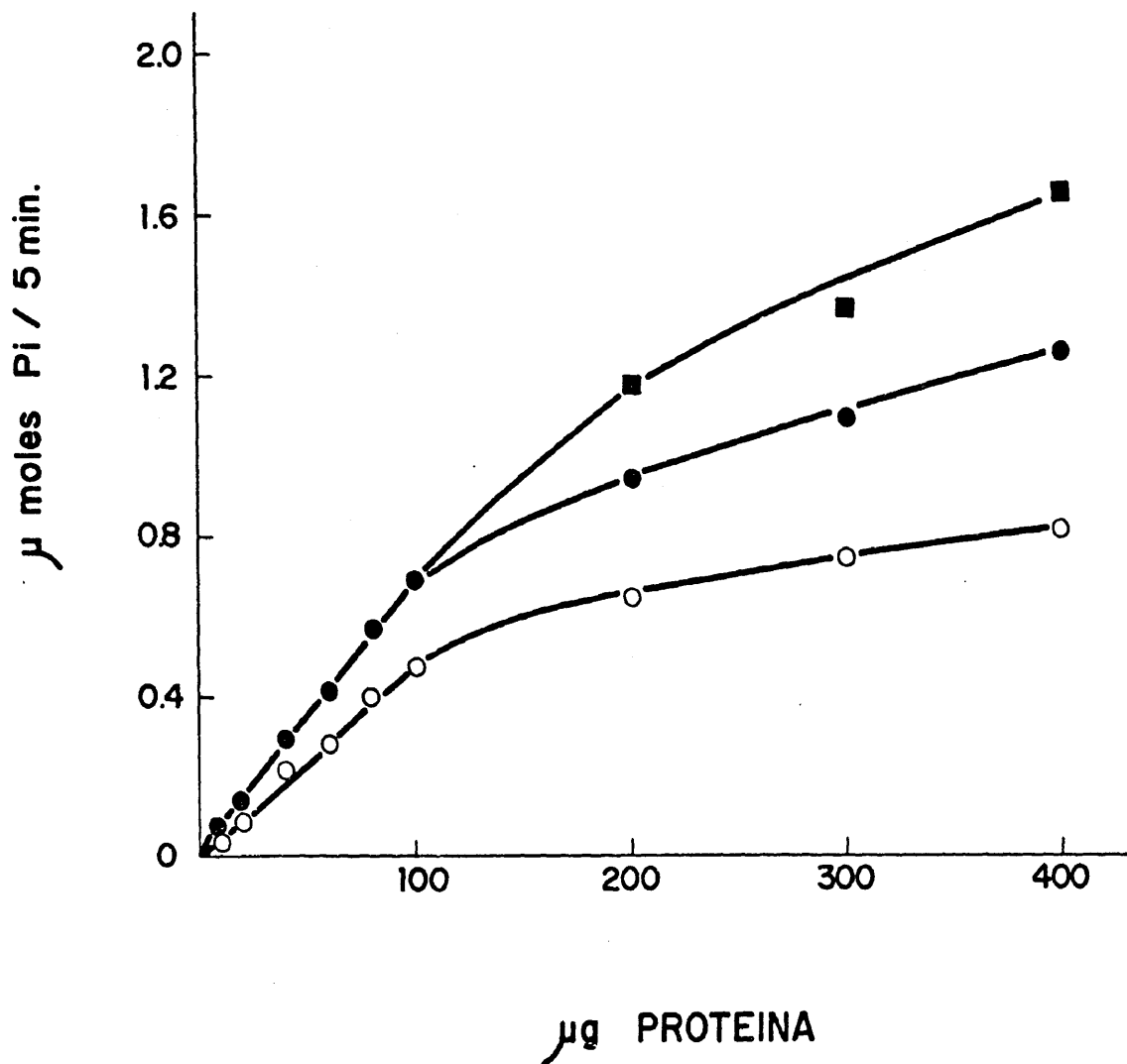


Fig. 21 - Curva de velocidad de la ATPasa unida a la membrana en función de la concentración de proteína. La actividad fué ensayada como se indicó en Materiales y Métodos. La proteína del medio de reacción está referida a proteína total de membrana. La velocidad se ha determinado: $\circ - \circ$ en ausencia de tripsina; $\bullet - \bullet$ en presencia de la concentración normal de tripsina; $\blacksquare - \blacksquare$ en presencia de una cantidad de tripsina igual a la de proteína total en el medio de ensayo.

creemos que no explica el cambio de linealidad en la velocidad enzimática.

La falta de proporcionalidad entre la velocidad y la concentración de enzima se puede atribuir a un agotamiento parcial del sustrato. No es del todo imposible que esto haya ocurrido; ahora bien, teniendo en cuenta que nosotros ponemos 4 μ moles de ATP en el medio de reacción y que en el mejor de los casos sólo se había hidrolizado 1 μ mol en presencia de 150 μ g de proteína de membrana, no parece probable que la cantidad de enzima presente carezca del sustrato necesario para actuar a velocidad máxima. Cantidades de sustrato comprendidas entre 2 y 4 μ moles de ATP en medio de reacción están muy próximas a una concentración óptima de sustrato para concentraciones de proteína de membrana cercanas a 100 μ g en medio de reacción. No obstante, esta posibilidad no debe excluirse totalmente.

Como tendremos ocasión de comentar más tarde, los productos finales de la hidrólisis del ATP son inhibidores de la reacción enzimática que los origina. Este hecho puede ser el responsable de la pérdida de proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración de enzima. Cada mol de ATP produce dos moles de productos finales que están compitiendo por la enzima con el sustrato. Este efecto por sí solo es de gran importancia cuando la velocidad de reacción es elevada, como sucede a altas concentraciones de enzima.

La aparición rápida de los productos finales en el medio de ensayo irá frenando progresivamente la velocidad de reacción, llegando a influir en la linealidad del proceso. Creemos que la acción inhibidora de los productos de la reacción puede ser la responsable única de la caída de linealidad. Y en todo caso este efecto asociado con el agotamiento parcial de sustrato dan razón satisfactoria de que la velocidad de la ATPasa asociada a la membrana no sea lineal al aumentar la cantidad de enzima.

Otro aspecto distinto es el que nos relaciona la concentración de tripsina con la de ATPasa ligada a la membrana. La gráfica también se curva hacia abajo pero menos que en los demás casos. Una explicación inmediata estaría en considerar insuficiente la concentración de tripsina que habitualmente se utiliza, cuando se va incrementando la cantidad de proteína de membrana. De hecho la concentración de tripsina tiene un óptimo, por debajo del cual su capacidad de estimulación determinada como actividad ATPásica, está disminuida.

La Fig. 22 expresa el comportamiento de la actividad de la ATPasa soluble frente a concentraciones crecientes de la misma enzima. Una vez más la velocidad de reacción es lineal a bajas concentraciones de ATPasa y se curva por encima de 40 a 50 μ g de proteína total soluble.

Las interpretaciones que se pueden ofrecer de estos hechos coinciden esencialmente con las expuestas para el caso de ATPasa

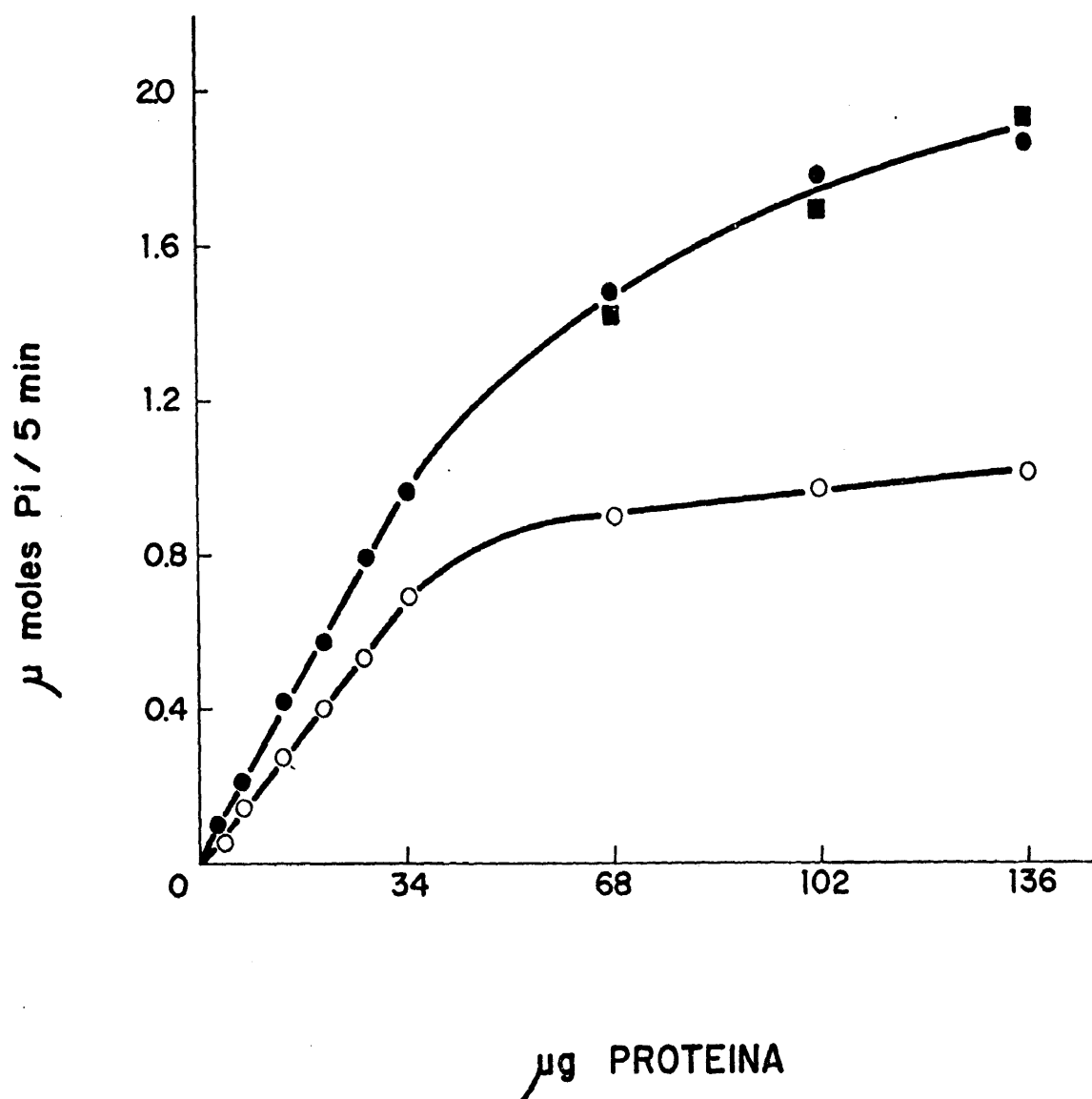


Fig. 22 - Velocidad de la ATPasa soluble con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9 en funci3n de la concentraci3n de prote3na. Esta prote3na viene expresada como prote3na total solubilizada. Como en la gr3fi- ca anterior, $\circ-\circ$ actividad en ausencia de tripsina; $\bullet-\bullet$ en presen- cia de tripsina; $\blacksquare-\blacksquare$ con cantidades crecientes de tripsina dobles que las de prote3na total.

asociada a la membrana. El agotamiento de sustrato que aquí podría ser más crítico ya que la enzima soluble tiene mayor actividad que la unida a la membrana, ha sido contrarrestado permitiendo un tiempo de reacción de sólo 3 min. Con esto la cantidad de ATP hidrolizada en muestras con 50 μ g de proteína soluble no llegaba a la cuarta parte del sustrato puesto en el medio de reacción; situación semejante e incluso mejor que la referida a ATPasa de membrana. A pesar de todo no puede descartarse que el agotamiento parcial de sustrato sea un factor importante en la caída de linealidad, en especial teniendo presente que los productos finales son inhibidores competitivos de la reacción y por lo tanto prácticamente están disminuyendo la concentración real de sustrato en el medio de reacción.

Un aspecto nuevo de la fracción soluble es que el aumento de tripsina proporcional al de enzima soluble, no tiene efecto alguno en la velocidad de reacción. La experiencia con cantidad de tripsina constante y la efectuada con cantidades crecientes de la proteasa coinciden totalmente dentro del intervalo comprendido en la Fig. 22. Sin embargo, para concentraciones de proteína soluble del orden de 300 a 340 μ g por tubo de ensayo, existe una notable diferencia entre las muestras que tienen tripsina a la concentración normal y las que la tienen a una concentración equivalente a la de la ATPasa soluble.

Estos resultados están indicando que la concentración de tripsina empleada habitualmente es suficiente para mantener una máxima

estimulación dentro del rango de concentraciones de ATPasa soluble, estudiado en la Fig. 22, lo que no sucede para las mismas concentraciones de ATPasa asociada a la membrana ni para concentraciones mucho mayores de la fracción soluble. La explicación es evidente teniendo en cuenta que la tripsina no tiene especificidad para la ATPasa ni otras proteínas determinadas; su acción es general y tanto menos restringida cuantitativamente a la ATPasa cuanto mayor sea la proporción de otras proteínas presentes al mismo tiempo. Por esta razón la ATPasa unida a la membrana necesita más tripsina que la soluble para conseguir un mismo efecto estimulador, ya que la presencia de las otras proteínas de membrana está restando una notable cantidad de tripsina que no puede ser utilizada por la ATPasa.

Relación entre la concentración de Mg^{2+} y ATP para una actividad enzimática óptima.

Son ampliamente conocidos los requerimientos de muchas enzimas para cationes monovalentes y sobre todo divalentes. ATPasas de organismos superiores como de mitocondrias (164) necesitan Mg^{2+} para su actividad; ATPasas de cloroplastos (137) y retículo sarcoplásmico (174) son activas en presencia de iones Ca^{2+} ; ATPasas bacterianas como la de Micrococcus lysodeikticus (138) son esencialmente activadas por iones Ca^{2+} , otras como la de Bacillus megaterium (167) parecen no tener una especial preferencia por Ca^{2+} ó Mg^{2+} ; por último la ATPasa de Streptococcus faecalis (175) y la de E. coli (172)

son dependientes de Mg^{2+} para su actividad, al menos a pH fisiológico puesto que a pH altos también el Ca^{2+} aparece como activador.

A la vista de estos resultados necesitábamos saber cuáles eran los requerimientos de la ATPasa de E.coli para el catión Mg^{2+} en sus dos formas, unida a la membrana y soluble, y cuál la relación de la concentración de este ión con la concentración de ATP en el medio de reacción. La fig. 23 representa una curva de saturación de Mg^{2+} para una concentración de ATP constante. El ATP fué conservado en todas las experiencias igual a 8 mM.

En ausencia de Mg^{2+} la actividad enzimática es indetectable, al menos empleando los tiempos normales de reacción. Concentraciones crecientes de Mg^{2+} determinan un rápido aumento de la actividad hasta alcanzar un máximo a concentración 4 mM. A partir de ese óptimo las actividades disminuyen de nuevo ininterrumpidamente como una respuesta a las concentraciones de Mg^{2+} que van en aumento. Todo indica que la relación Mg^{2+}/ATP tiene un óptimo que coincide con el valor de 1/2. y ello con independencia de que la actividad medida corresponda a ATPasa unida a membranas con tripsina o sin ella, o a la ATPasa soluble en idénticas condiciones.

Una concentración de un mol de Mg^{2+} por dos de ATP parece expresar la situación más ventajosa para una mejor actividad hidrolítica de la ATPasa de E.coli en cualquiera de los estados en que se la ha estudiado.

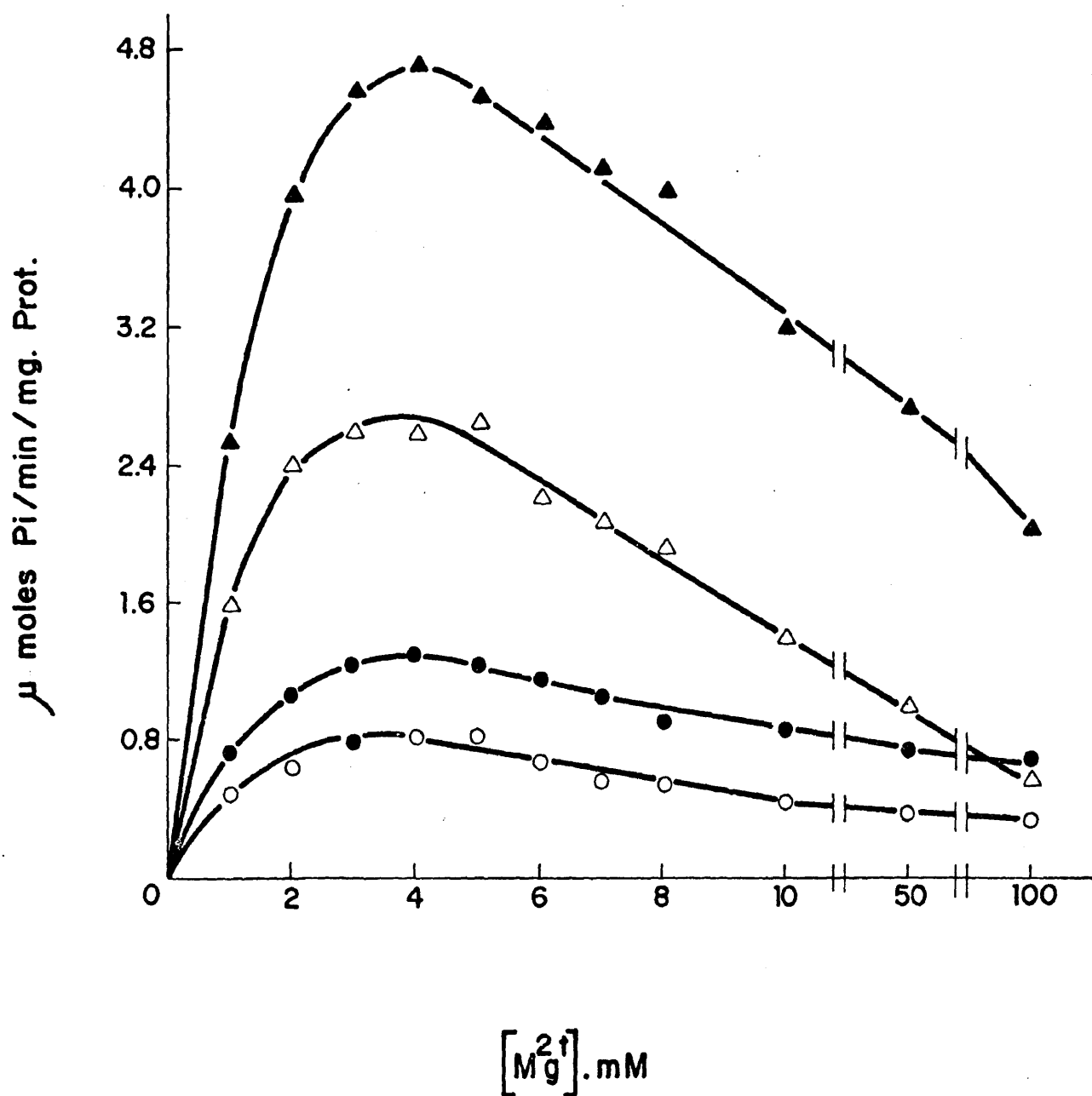


Fig. 23 - Inhibición por altas concentraciones de Mg^{2+} libre. El ATP se mantuvo constante (8 mM) para todas las concentraciones de Mg^{2+} . ○—○ ATPasa unida a membranas ensayada sin tripsina. ●—● ATPasa unida a membranas determinada con tripsina. △—△ ATPasa soluble ensayada sin tripsina. ▲—▲ ATPasa soluble con tripsina en el medio de reacción.

Otro aspecto de gran importancia que se desprende de esta experiencia es que el Mg^{2+} libre a altas concentraciones se convierte en inhibidor de la actividad enzimática. Inhibiciones del 78 y 60% pueden observarse para la fracción soluble media en ausencia y presencia de tripsina respectivamente, cuando la concentración de Mg^{2+} es 100 mM; e inhibiciones un poco menores para la enzima unida a la membrana. En todo caso concentraciones de Mg^{2+} iguales a las de ATP son suficientemente indicativas del efecto inhibidor del catión.

El valor encontrado para la relación Mg^{2+}/ATP está de acuerdo con otros valores que existen ya en la literatura científica. La ATPasa mitocondrial (176) registra su óptima actividad cuando la relación de molaridad Mg^{2+}/ATP vale 0,67 y E.coli (112, 118) cuando vale 0,5. Actividades óptimas en condiciones de equimolaridad entre el catión y el ATP han sido descritas para Micrococcus lysodeikticus (138) y Streptococcus faecalis (175). Ishida y col. (166) encontraron una relación variable dependiendo del pH a que trabajaban.

Inhibición de ATPasa de E.coli por altas concentraciones de ATP libre.
=====

Con objeto de determinar con más precisión el efecto del Mg^{2+} y del ATP en la reacción de la ATPasa en todas sus formas, hemos elaborado una experiencia en que se satura la enzima con cantidades crecientes de ATP, mientras la concentración de Mg^{2+} permanece inalterada, y la hemos comparado con otra en la cual la saturación de la enzima se hace con $Mg^{2+} : ATP$ en relación 1 : 2. Los resultados pueden obser-

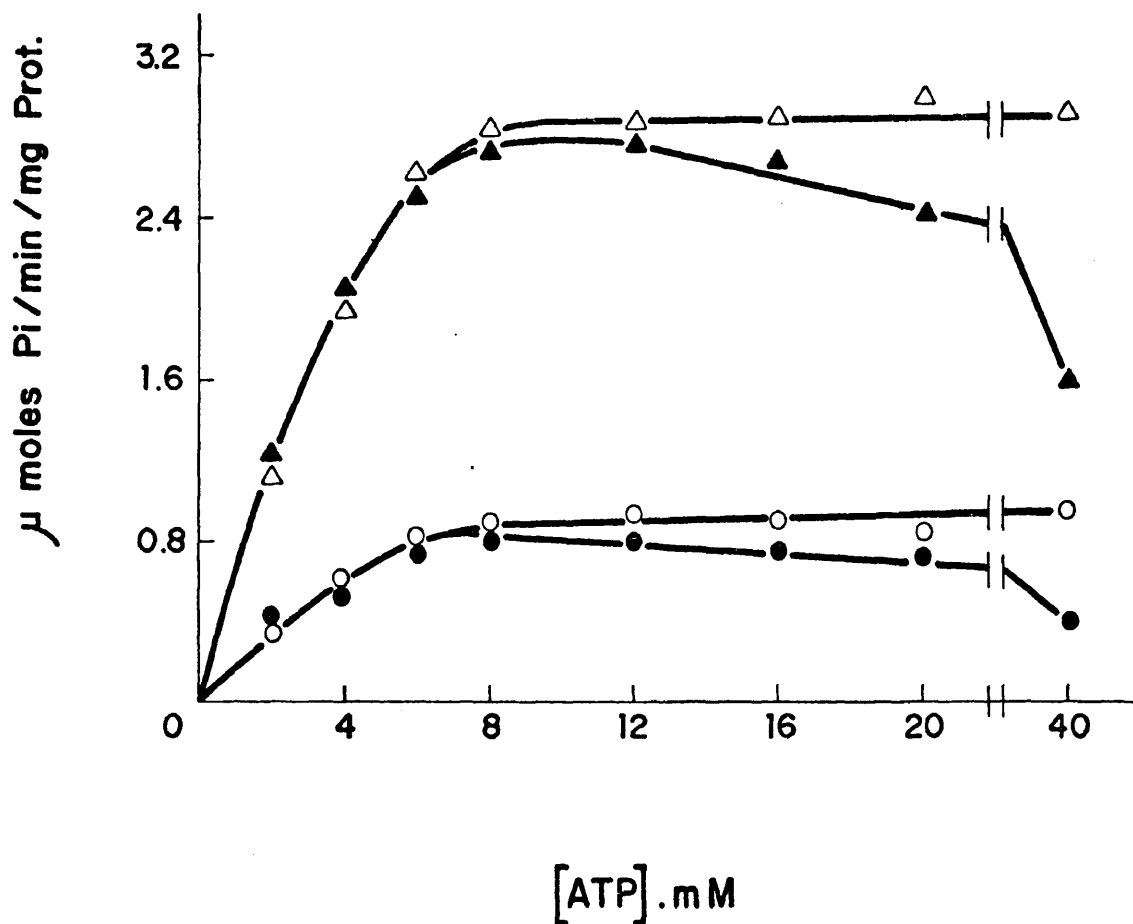


Fig. 24 - Inhibición de ATPasa por altas concentraciones de ATP libre, determinada en ausencia de tripsina. ●-● Actividad enzimática de ATPasa unida a membranas a concentración de Mg^{2+} constante, 4 mM. ○-○ Actividad de ATPasa unida a membranas a concentración de Mg^{2+} 1/2 de la de ATP. ▲-▲ Actividad de ATPasa soluble a concentración de Mg^{2+} constante 4 mM. △-△ Actividad enzimática guardando la relación Mg^{2+}/ATP igual a 1/2.

varse en la Fig. 24. Por encima de una concentración de ATP 8mM las gráficas que tienen una concentración de Mg^{2+} constante, 4 mM, comienzan a decaer, signo evidente de un decrecimiento en su actividad enzimática. Las dos restantes con una relación $Mg^{2+}/ATP = 1/2$ en todas sus concentraciones, mantienen constante la actividad aun a concentraciones de sustrato unas cinco veces superiores al óptimo. Todas las actividades de esta Fig. 24 están efectuadas en ausencia de tripsina.

Los resultados de esta experiencia demuestran que concentraciones de ATP libre más allá de la relación $Mg^{2+}/ATP = 1/2$ resultan inhibitoras de la actividad ATPásica, tanto más cuanto más elevada es la concentración de ATP libre, no siendo exclusivo este comportamiento de la ATPasa en su forma soluble, ni de la unida a la membrana. Ambas formas muestran también ausencia de inhibición cuando la relación catión ATP es óptima, a cualquier concentración de sustrato.

La Fig. 25 representa una experiencia totalmente similar a la Fig. 24 pero efectuada con tripsina en el medio de reacción. De nuevo nos encontramos con que para una concentración de Mg^{2+} 4 mM las curvas de saturación de ATP manifiestan una clara inclinación hacia abajo por encima de concentraciones de ATP 8 a 10 mM. Esta inclinación deja de existir con solo incrementar las cantidades de Mg^{2+} simultaneamente con las de ATP en una relación de 1 a 2. Todo indica que también en presencia de tripsina altas concentraciones de ATP libre resultan inhibitoras de la actividad enzimática de la ATPasa en

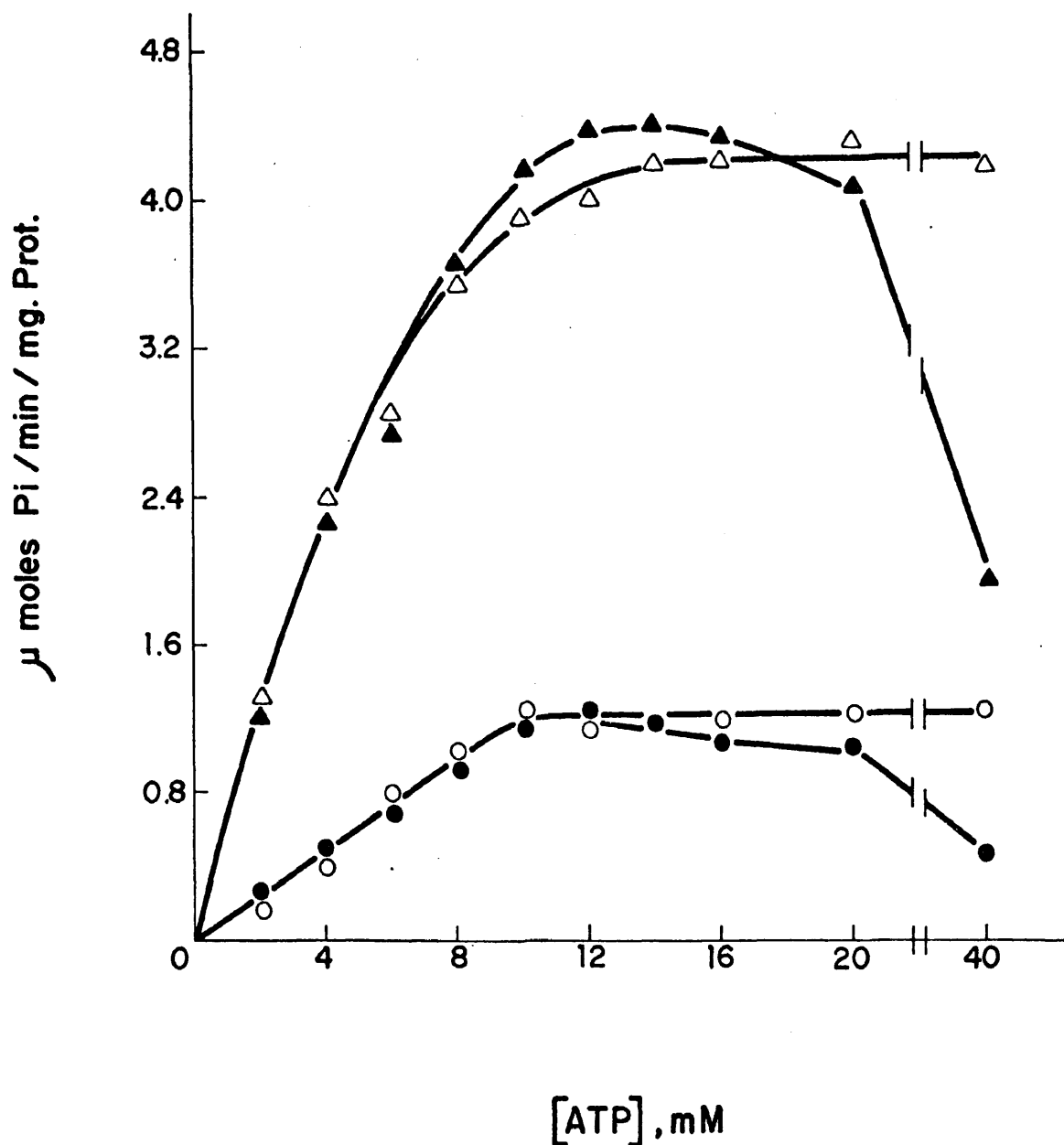


Fig. 25 - Inhibición de la ATPasa por altas concentraciones de ATP libre, ensayada en presencia de tripsina. Actividad enzimática de ATPasa: ●-● Unida a membranas a concentración de Mg^{2+} 4 mM; ○-○ Unida a membranas a relación Mg^{2+}/ATP igual a 1/2; ▲-▲ Soluble a Mg^{2+} 4 mM. Δ-Δ Soluble a concentración de Mg^{2+} 1/2 de la de ATP.

todas las formas estudiadas, mientras que el $Mg^{2+}/ATP=1/2$ no se mostró inhibidor en absoluto aun a concentraciones bastante elevadas.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de Ulrich en ATPasa mitocondrial (176) y con los de Ishida y col. (166) en ATPasa de *Bacillus megaterium*, en cuanto a la inhibición por ATP libre, pero disienten de los de Ulrich en el aspecto de que nuestro $Mg^{2+}:ATP=1/2$ no es inhibidor de la actividad en ningún caso.

Cinética de saturación de sustrato.

Prescindiendo de la naturaleza del verdadero sustrato de la ATPasa, incluimos bajo la denominación de sustrato al Mg^{2+} y al ATP en relación 1:2 porque ambos son indispensables en esa proporción para una óptima actividad enzimática.

De acuerdo con la precedente afirmación, la Fig. 26 muestra la curva de saturación de sustrato para la ATPasa de *E.coli* asociada a la membrana tanto en ausencia como en presencia de tripsina. La curva presenta una forma típica Michaeliana en ambos casos, que puede interpretarse como indicio de independencia de sitios.

La Fig. 27 es la curva de saturación de sustrato para la ATPasa en su estado soluble, ya determinado sin tripsina, ya con la proteasa en el medio de ensayo. El aspecto de estas curvas es muy distinto del de las anteriores. La forma sigmoide de las gráficas implica la existencia de interacciones entre las subunidades, interacciones que deben ser de tipo cooperativo, denominadas también efectos homó-

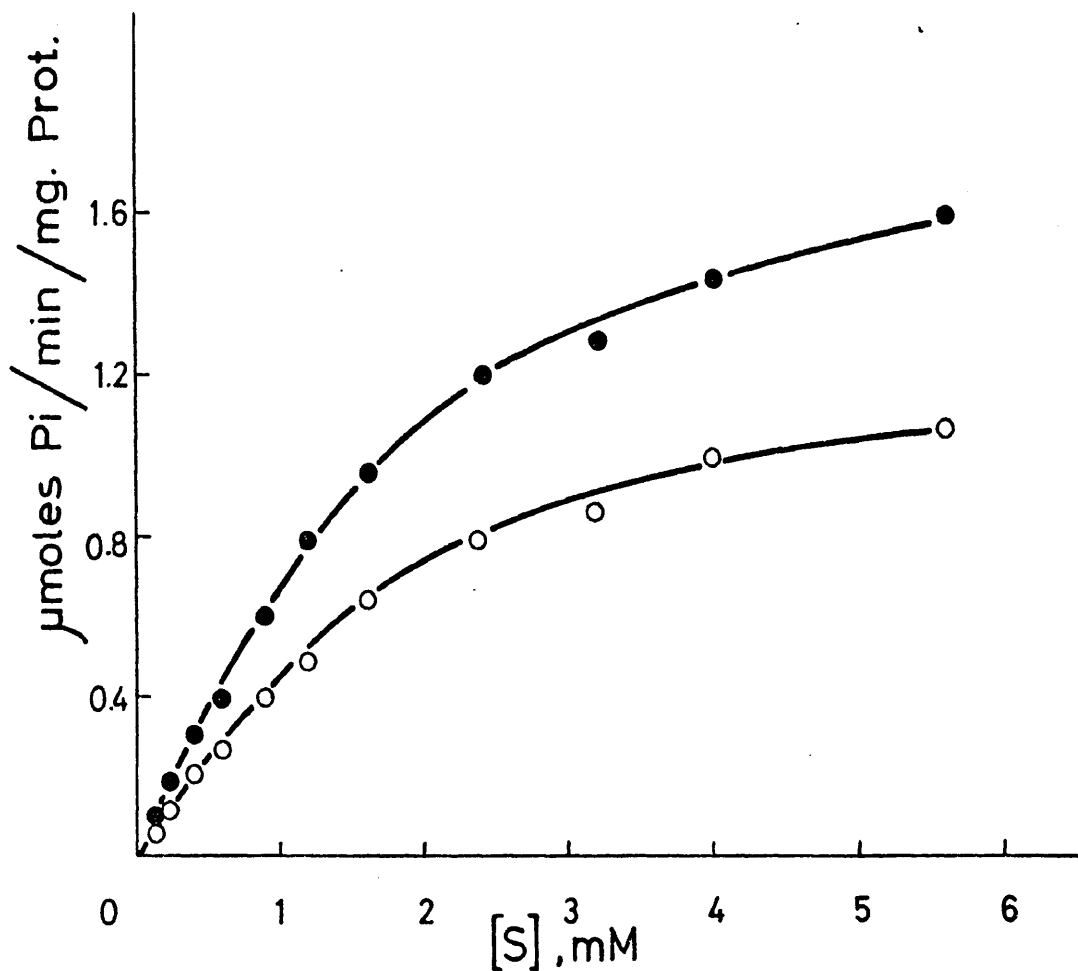


Fig. 26 - Curva de saturación de sustrato para la ATPasa asociada a la membrana. Bajo la denominación de sustrato se incluye Mg^{2+} y ATP en relación 1/2. Las concentraciones que figuran en abscisas están referidas al ATP, siendo las de Mg^{2+} mitad de estas.

●—● Con tripsina. ○—○ Sin tripsina.

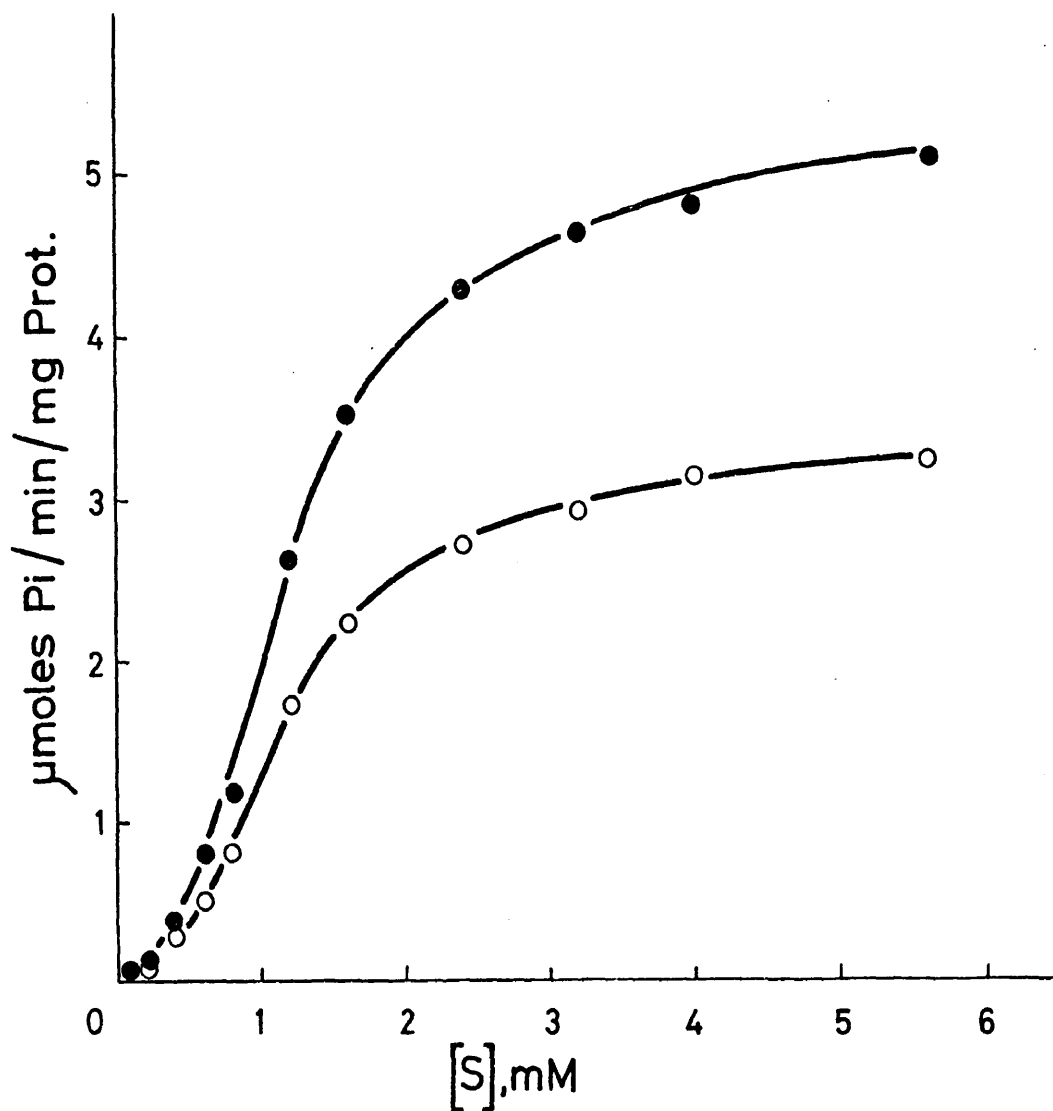


Fig. 27 - Saturación de sustrato de la ATPasa solubilizada con EDTA 3 mM en Tris 50 mM pH 9. Al igual que en la Fig. anterior las concentraciones de sustrato que aparecen en la gráfica responden a las cantidades reales de ATP. La concentración de Mg^{2+} es 1/2 de la de ATP. ●-● Con tripsina. ○-○ Sin tripsina.

Cabe resaltar la diferencia de comportamiento cinético entre la enzima asociada a la membrana y la solubilizada. Confirmación de propiedades alotópicas, esta diferencia puede ser el reflejo de regulaciones impuestas por el ambiente de la membrana, conducentes a mantener el equilibrio dentro de las propiedades multifuncionales de la ATPasa.

Representación doblemente recíproca de Lineweaver-Burk

Las representaciones directas de velocidad frente a concentración del sustrato, tanto en su forma hiperbólica como sigmoide, ofrece una valoración cuantitativa de parámetros cinéticos muy escasa e insegura. Por esta razón han aparecido otros métodos de calcular la K_m y la V_m de general interés, entre los que merece especial relevancia el de Lineweaver-Burk (178).

La Fig. 28 muestra la representación doblemente recíproca de la ATPasa asociada a la membrana. La actividad ha sido medida en presencia y ausencia de tripsina, como se indica en la Fig. . Las V_m s calculadas según este método, arrojan unos valores de 1.6 para la enzima ensayada en ausencia de tripsina, y de 2.4 para la ATPasa determinada con tripsina en el medio de reacción. Sin embargo la K_m cuyo valor único es de 2.5 mM, no muestra ninguna diferencia por el hecho de que la tripsina esté presente o no en el medio de reacción. Como consecuencia más obvia se sigue que la acción de la tripsina no altera la afinidad del sustrato por la ATPasa porque no hace variar la K_m para dicho sustrato.

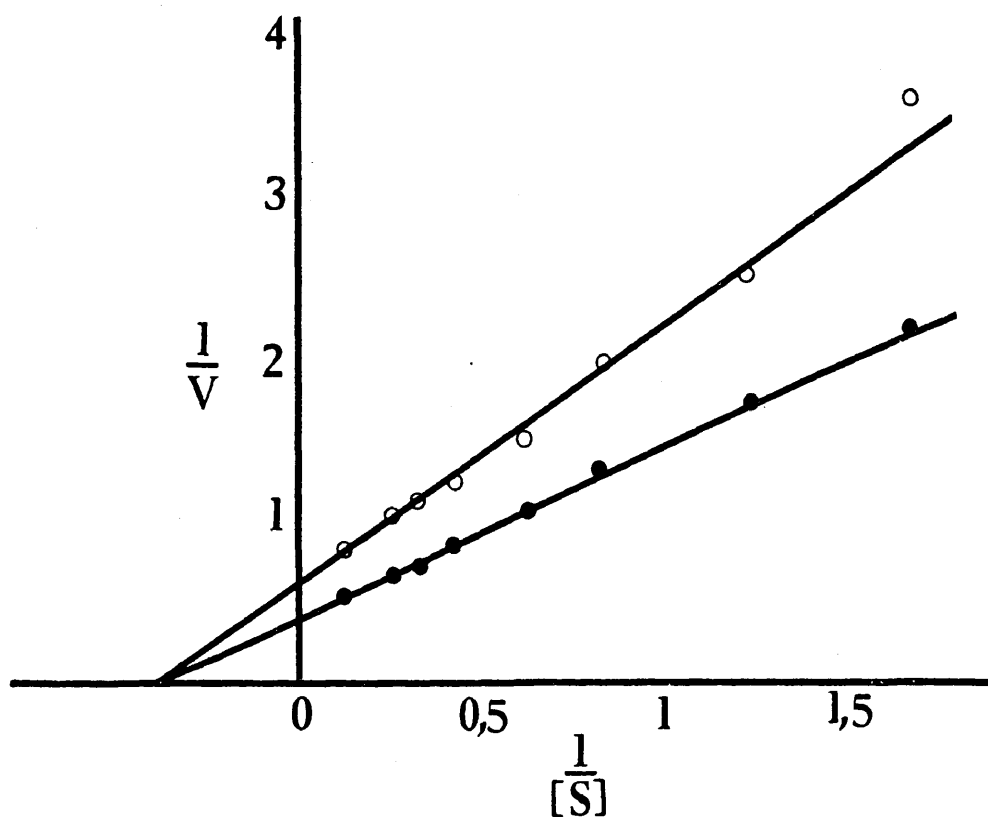


Fig. 28 - Representación de Lineweaver-Burk para la ATPasa unida a la membrana. En la concentración de sustrato incluimos ATP y Mg^{2+} en relación 2/1. ●—● ATPasa determinada en presencia de tripsina; ○—○ ATPasa ensayada en ausencia de tripsina.

No obstante la velocidad de hidrólisis aparece fuertemente incrementada, lo que implica el correspondiente aumento de la constante de velocidad en el sentido de rotura del complejo enzima-sustrato en sus respectivos productos finales.

La Fig. 29 muestra la representación de Lineweaver-Burk para la ATPasa de *E. coli* en su estado soluble. Como consecuencia de la forma sigmoideal de las representaciones directas, estas gráficas de dobles recíprocas presentan una marcada curvatura hacia arriba. La determinación de los parámetros cinéticos, en tal caso, ofrece algunas dificultades debido a la inseguridad de operar en una zona de linearidad probada. A pesar de estos inconvenientes creemos que los valores ofrecidos aquí son bastante garantía ya que coinciden con otros hallados por nosotros en diferentes ocasiones y con distintos métodos de valoración de actividad enzimática. Admitiendo una razonable linealidad para las curvas a altas concentraciones de sustrato, los valores de los V_{ms} son de 4 para la fracción soluble ensayada sin tripsina y de 6.6 para la misma enzima medida en presencia de tripsina.

La K_m o $[S_{0.5}]$ expresada como concentración de sustrato a un 50% de saturación, nos dió un valor único de 1.2 mM. Suponiendo, por la forma de la curva, que la enzima tiene más de un sitio de interacción con el sustrato, es decir, que cada molécula de enzima interacciona con más de una molécula de sustrato, la K_m es el producto de los n constantes de disociación o de Michaelis para los distintos pasos separados de fijación.

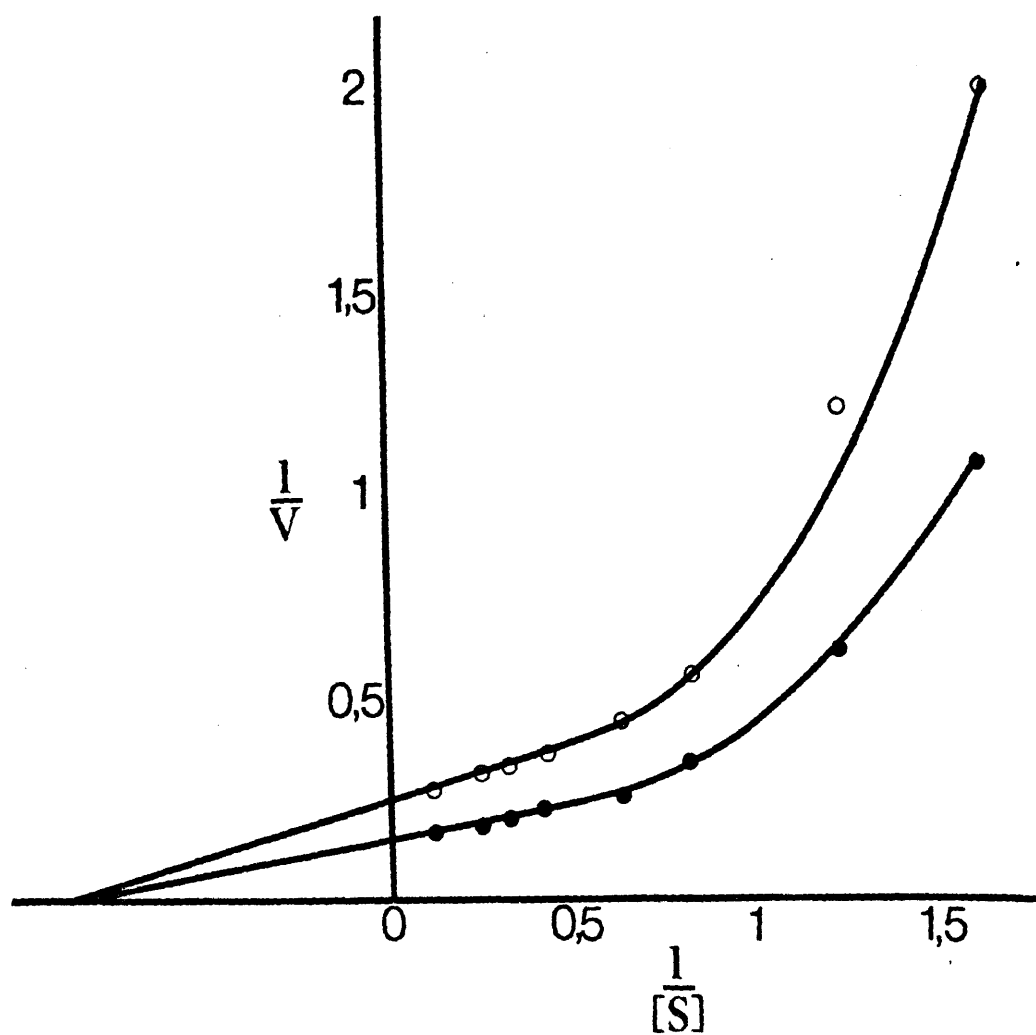


Fig. 29 - Representación de Lineweaver-Burk para la ATPasa soluble. ● - ● Actividad determinada en presencia de tripsina; ○ - ○ Actividad en ausencia de tripsina.

Una vez más hemos de advertir que la tripsina cuyo mecanismo de acción desconocemos no tiene ningún efecto sobre la afinidad del sustrato por la ATPasa. Su acción contemplada desde este punto de vista cinético no tiene más respuesta que el aumento de una constante de velocidad que se traduce en un mayor rendimiento de productos finales.

Un aspecto a destacar es la diferencia de valores para la K_m en los dos estados estudiados. Aun a conciencia de esta pequeña diferencia, corta pero destacable en todas las preparaciones en que se comparan ambos estados de la enzima, creemos que la afinidad entre el sustrato y la ATPasa es mayor al estado soluble que unida a la membrana. Esta afirmación vendría a corroborar la ya notable diferencia de comportamiento cinético reseñada en el párrafo anterior. Conclusiones que comienzan a abogar por un mecanismo de acción de la ATPasa soluble netamente distinto del empleado por la enzima unida a la membrana.

Coeficientes de interacción de la ATPasa de *E. coli*

Una de las técnicas más útiles y empleadas para obtener información acerca del proceso de unión del sustrato con la enzima, se debe a Hill (179) quien la aplicó por vez primera a la curva de fijación del oxígeno a la hemoglobina. De acuerdo con la ecuación de Hill, una función de la fracción de sitios ocupados representada frente a la concentración de sustrato, o de otro ligando, puede dar una curva sigmoide, pero aun en este caso, el log. de esa función frente al log $[S]$

o de otro ligando, dan lugar a una línea recta. La pendiente de esta recta tiene un notable valor informativo para conocer el mecanismo por el cual el ligando se fija a la enzima.

La Fig. 30 muestra la representación de Hill de la ATPasa de E.coli. Las dos rectas inferiores responden a la enzima ligada a la membrana, ensayada con tripsina y sin ella, mientras que las dos gráficas superiores fueron obtenidas con la ATPasa soluble medida en las mismas condiciones que la unida a la membrana.

Según estos resultados, la ATPasa asociada a la membrana bacteriana tiene un coef. de Hill de 0.92. Teniendo en cuenta que este coeficiente representa una combinación del número de sitios y de la fuerza de interacción entre ellos, su valor debe interpretarse como el mínimo número de sitios ocupados. Un coeficiente próximo a la unidad es indicativo de una total independencia de sitios, pero no significa que exista un solo sitio. La comparación del coef. de Hill con el número total de sitios, cuando se conocen, nos ofrecen una medida de la cooperatividad, que será tanto mayor cuanto más próximos estén estos dos valores.

El coeficiente de 0.92 que nosotros encontramos para la ATPasa unida a membranas nos sugiere que los diferentes sitios de la enzima, no interaccionan entre sí, o que quizás interaccionen anti-cooperativamente si consideramos que el valor de 0.92 está bastante alejado de la unidad. Esta conclusión válida igualmente para la enzima

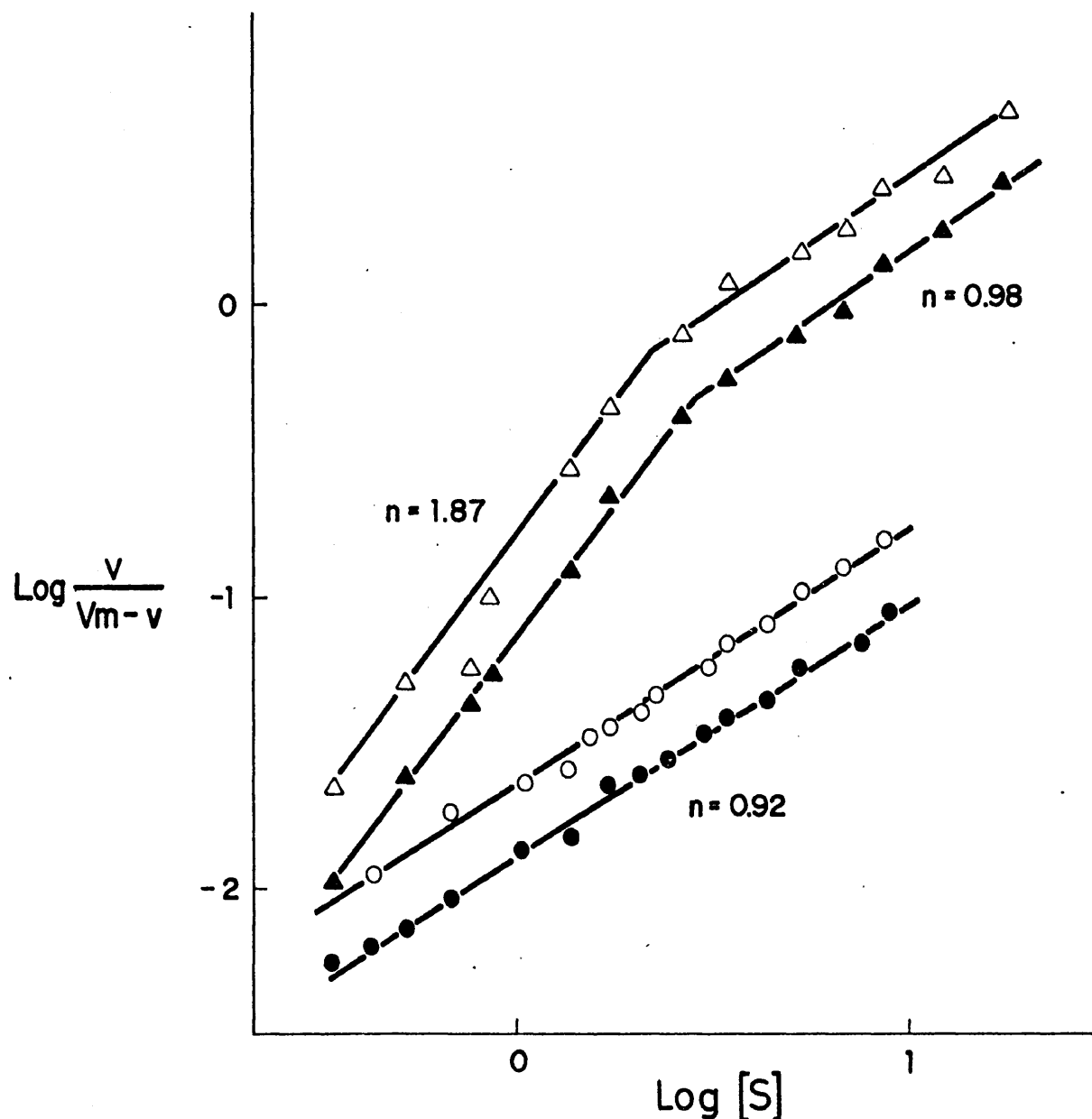


Fig. 30 - Representación de Hill de la ATPasa de *E.coli*. La relación Mg^{2+}/ATP se mantuvo en su óptimo en todas las experiencias.

La enzima unida a la membrana da un coeficiente de Hill de 0.92 tanto ensayada en presencia $\bullet \rightarrow \bullet$, como en ausencia de tripsina $\circ \rightarrow \circ$.

Sin embargo la ATPasa soluble presenta dos coeficientes distintos, uno de 1.87 por debajo del punto medio de la curva de saturación y otro de 0.98 por encima de dicho punto. $\blacktriangle \rightarrow \blacktriangle$ Ensayada con tripsina en el medio de reacción; $\triangle \rightarrow \triangle$ sin tripsina en un ensayo.

ensayada con tripsina y sin ella, está de acuerdo con los resultados presentados con anterioridad.

Las gráficas superiores de la Fig. 30 se refieren al coef. de Hill para la ATPasa soluble. Observamos un coef. de 1.87 para bajas concentraciones de sustrato y otro de 0.98 para las concentraciones superiores. El punto de cambio de pendiente corresponde aproximadamente al 50% de saturación de sustrato.

La interpretación de estos datos no es inmediata. Un coef. de Hill de 1.87 supone interacción de sitios, expresada como una cooperatividad positiva entre ellos y uno de 0.98 indica independencia de sitios. Ahora bien la presencia de dos coeficientes de Hill distintos para un mismo sustrato es algo poco frecuente. De acuerdo con Cook y Koshland (180) podemos suponer que la unión de la primera molécula de sustrato a la enzima facilita la unión para una segunda y así sucesivamente, dando lugar a una cooperatividad positiva reflejada en el coeficiente de 1.87; pero esto no tendría lugar en todos los sitios de la enzima. A partir de un determinado número de sitios ocupados, la unión de cada nueva molécula de sustrato sería dificultada por la fijación de la anterior, lo que ocasionaría una cooperatividad negativa o anticooperatividad. Tampoco debe excluirse la posibilidad de que a partir de ese número de sitios ocupados la adición de nuevas moléculas de sustrato no sean facilitadas, ni dificultadas. Esta última explicación está más en consonancia con el valor de 0.98 obtenido para el coef. de interacción a concentraciones relativamente altas de sus-

trato. Bajo otro concepto podemos expresar la misma realidad, imaginando que las constantes intrínsecas de unión van inicialmente en aumento, es decir, $K_1 < K_2 < K_3 \dots$; pero sólo hasta cierto punto. De ahí en adelante cada constante sería menor que la anterior. Si suponemos que hay seis sitios, podríamos representarlos de esta forma $K_1 < K_2 < K_3 < K_4 > K_5 > K_6$. En la segunda posibilidad de que los últimos sitios sean independientes tendríamos que las tres últimas constantes serían iguales. Sin olvidar que nuestros resultados son producto de determinación de velocidades iniciales y no de fijación de sustrato, creemos poder afirmar que disponemos de sugestivas indicaciones acerca del comportamiento cinético de la ATPasa de E. coli tanto en su forma soluble como asociada con la membrana bacteriana. Esta última presenta indicios de independencia de sitios, mientras que la fracción soluble manifiesta un comportamiento más complejo, mezcla de cooperatividad positiva y probablemente en ausencia de toda cooperatividad.

Representación de Scatchard de la ATPasa de E. coli

=====

Representando $(S_b)(E_t) / (S_f)$ frente a $(S_b) / (E_t)$, donde $(S_b) / (E_t)$ expresa moles de ligando unido por mol de enzima y (S_f) concentración de ligando libre, se obtienen gráficas de notable interés para el conocimiento de la naturaleza y función de una enzima. Este método debido a Scatchard (181) y Klotz (182) se aplica fundamentalmente a problemas de fijación de cualquier tipo de ligandos a macromoléculas,

sistemas enzimáticos e incluso organizaciones supramoleculares más complejas.

La utilización de este método para el estudio de velocidades iniciales reviste una importancia muy relativa. No disponemos del número de moles de ligando fijados por mol de enzima, pero sí de algo que debe ser proporcional, las velocidades iniciales. Tampoco conocemos la concentración de ligando (en nuestro caso sustrato) libre en el medio de reacción, pero disponemos de una suposición sin la cual es inválida toda cinética de velocidades iniciales, que la concentración de sustrato libre se considera igual a la concentración total de sustrato (173).

Con esta aproximación creímos de interés ofrecer nuestros resultados en representaciones de Scatchard-Klotz, conforme a las deducciones hechas por Hofstee (183) para velocidades iniciales de reacción.

La Fig. 31 muestra la representación de Hofstee para la ATPasa asociada a la membrana. La interpretación de estas gráficas dista mucho de ser definitiva. Representaciones cuyos puntos forman una línea recta, implican ausencia de cooperatividad entre los diversos sitios activos y cuando dan origen a una curva con la concavidad hacia abajo, reflejan la existencia de cooperatividad positiva. Gráficas como las que se presentan en la Fig. 31, admiten al menos, una doble interpretación; o bien son debidas a cooperatividad negativa o bien proceden de heterogeneidad de sitios activos independientes. Si aceptamos

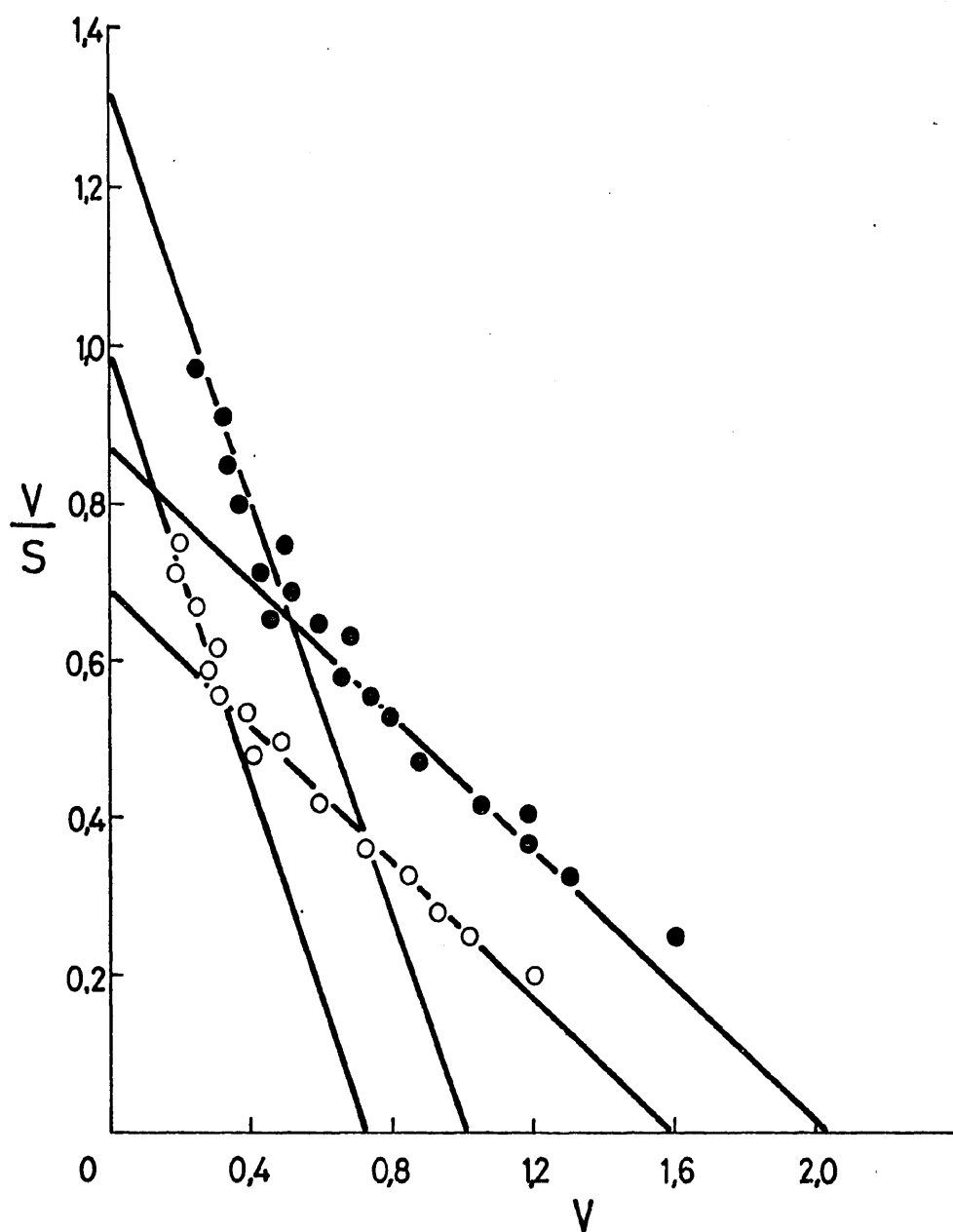


Fig. 31 - Representación de Scatchard de la ATPasa unida a la membrana de E.coli. La actividad fué ensayada de modo ordinario:
 ○ - ○ en ausencia de tripsina con una Km 2,2 mM y una velocidad máxima 1.58; ● - ● en presencia de tripsina con una Km 2.8 y una velocidad máxima 2.2

la primera posibilidad, la gráfica se convierte en una curva con la concavidad hacia arriba, en donde no es posible determinar K_m s ni extrapolar velocidades máximas; únicamente recordar que según el mecanismo de este tipo de cooperatividad, cada molécula de sustrato que se fija a la enzima hace más difícil la fijación para la siguiente molécula de sustrato. Si suponemos como válida la segunda posibilidad, podemos hacer un intento de cálculo de K_m s para los distintos grupos de afinidad. De acuerdo con las representaciones de la Fig. 31 tendríamos cierto número de sitios con elevada afinidad por el sustrato cuya K_m es 0,75 mM, y otro grupo de sitios que actúa a más altas concentraciones de sustrato con menor afinidad. Su K_m es aproximadamente 2,5 mM o probablemente mayor.

Experiencias hechas en idénticas condiciones que la de la Fig. 31. no mostraban una falta de linealidad tan acusada, Por esta razón no tenemos evidencia, por el momento, del comportamiento real de la ATPasa en su estado asociado a la membrana. Una cinética típica de Michaelis es también posible tomando únicamente como buenos los valores de la Fig. 31 más próximos a la K_m . Los valores de la K_m y V_{ms} coincidirían en tal caso con los deducidos de la representación de Lineweaver-Burk.

La Fig. 32 comprende la representación de Hofstee para la ATPasa soluble de E.coli. A diferencia de la enzima unida a la membrana, la fracción soluble presenta una alta cooperatividad como se desprende de la forma de las curvas. La extrapolación de las gráficas da

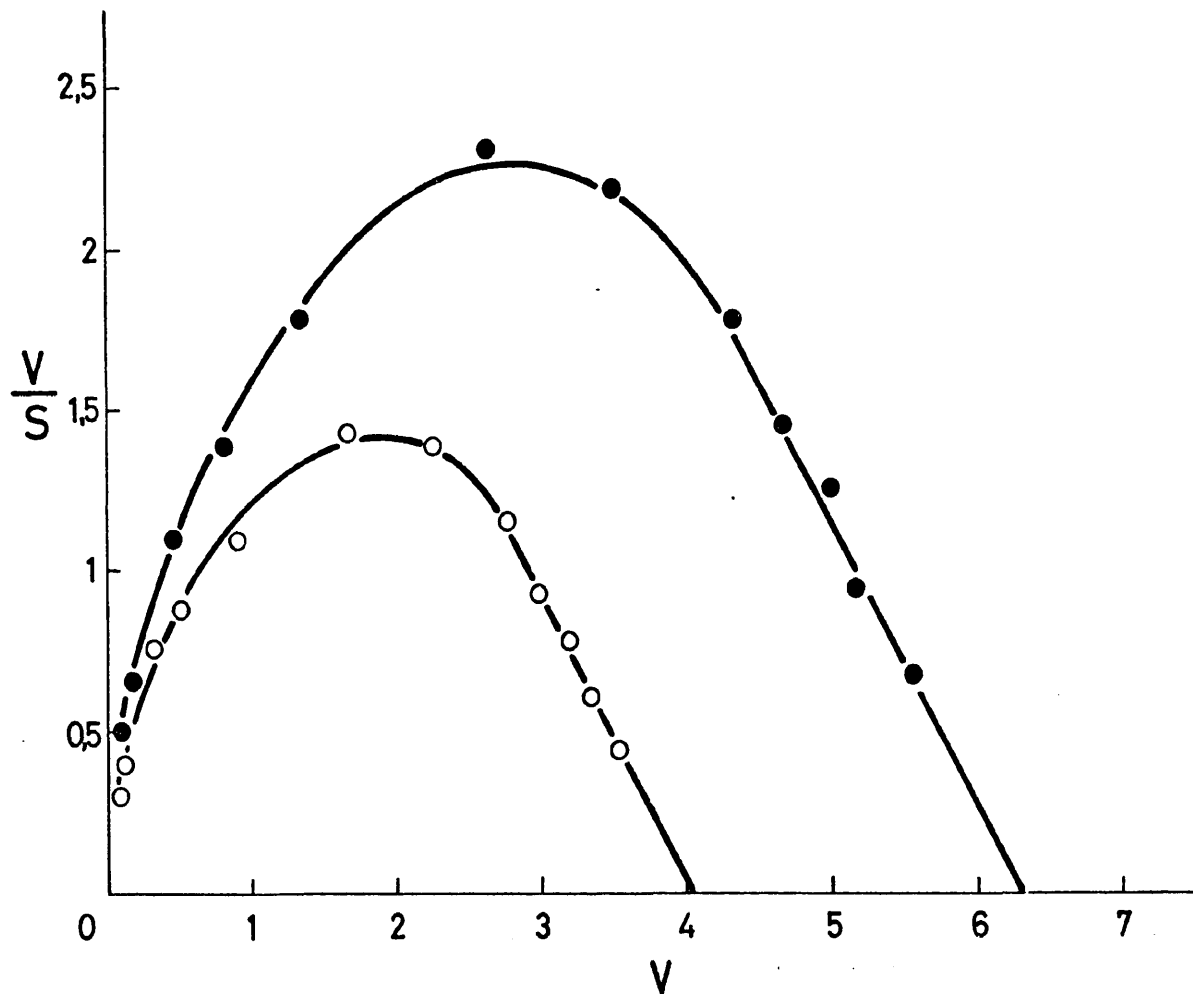


Fig. 32 - Representación de Scatchard de la ATPasa soluble con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. También esta actividad fué determinada en ausencia de tripsina ○-○ y en presencia de la proteasa.

●-● .

unas V_{ms} de 4 para la enzima ensayada en ausencia de tripsina y de 6.3 para la determinada con tripsina en el medio de ensayo. La K_m tal como se puede calcular por los segmentos rectos de las curvas arroja un valor aproximado de 1.2 mM, muy de acuerdo con los mismos valores hallados por otros métodos.

Los índices de cooperatividad, calculados de acuerdo a las técnicas de Taketa y Pogell (184) dan unos valores muy próximos a 20 para la ATPasa soluble, y 80 para la enzima asociada a la membrana. Un índice de 81 es el resultado que se considera indicativo de cinética típica Michaeliana. Índices superiores son debidos sólo a cooperatividad negativa, mientras que valores más bajos son debidos a efectos nomotrópicos positivos. Por consiguiente, nuestra fracción soluble muestra una neta cooperatividad positiva para la ATPasa, en tanto que la enzima ligada a la membrana parece tener cinética de Michaelis.

Todos los resultados de cinética que hemos presentado hasta aquí manifiestan una notable coincidencia. La ATPasa asociada a membranas, estudiada en las condiciones en que nosotros lo hemos hecho, tiene un comportamiento cinético que puede catalogarse de Michaeliano, salvo que la representación de Hofstee que ya hemos comentado, sea un reflejo inequívoco de heterogeneidad de sitios o anticooperatividad. Por otra parte, la ATPasa solubilizada con EDTA 3 mM en Tris 50 mM pH 9 y ensayada en las mismas condiciones que la unida a membranas, manifiesta, según todos los indicios, una alta cooperatividad positiva entre sus distintos sitios activos.

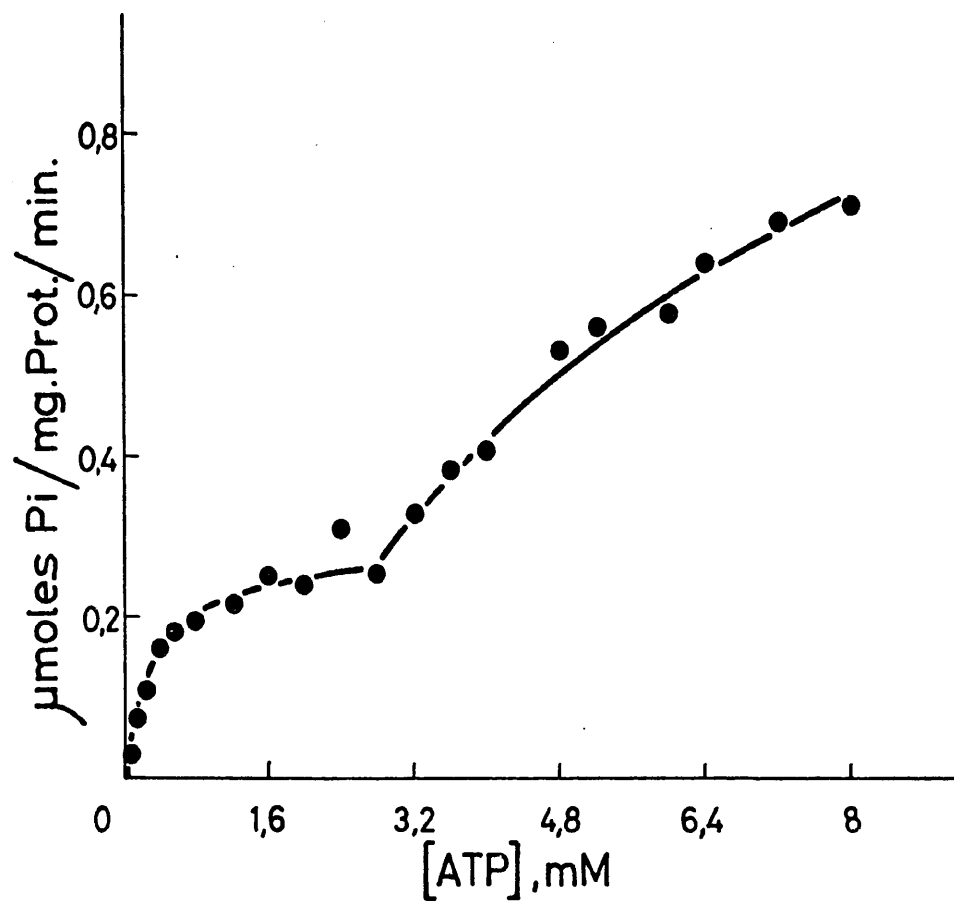


Fig. 33 - Saturación de ATP de la ATPasa asociada a la membrana.

La concentración de Mg^{2+} fué 4 mM en todas las muestras. La actividad fué determinada por métodos colorimétricos y radioactivos como se describe en Materiales y Métodos.

Estos dos tipos de comportamiento no se ven influidos en ningún caso por la acción de la tripsina.

Cinética de saturación de ATP

Hemos visto que la relación Mg^{2+}/ATP para una actividad óptima de la ATPasa es 0.5. Utilizando esta relación como el verdadero sustrato de la enzima hemos descrito los parámetros más característicos que definen de alguna manera el comportamiento de la ATPasa en sus dos estados de ligada a la membrana y soluble.

Una vez hecho esto nos interesaba conocer cuál era la cinética de saturación del ATP cuando la concentración de Mg^{2+} se mantenía constante; es decir 4 mM en todas las concentraciones de ATP. La Fig. 33 da cuenta de este hecho para la ATPasa asociada a la membrana. Todas las muestras fueron ensayadas en ausencia de tripsina con objeto de evitar los inconvenientes derivados de la destrucción de la ATPasa por la tripsina; pues ya sabemos que la presencia de Mg^{2+} hace más sensible la ATPasa a la acción trípica cuando aquella no se encuentra convenientemente protegida por el sustrato. Los resultados demuestran que en tales condiciones la enzima presenta una gráfica de saturación de ^{compleja}ATP. ~~Ap~~arentemente existe una saturación de ATP a concentración 1 mM, pero si continuamos incrementando esta concentración se inicia una nueva curva a ATP 2.8 mM.

La representación de Lineweaver-Burk se muestra en la Fig. 34. Las Kms de las dos curvas son del orden de 0,38 mM para

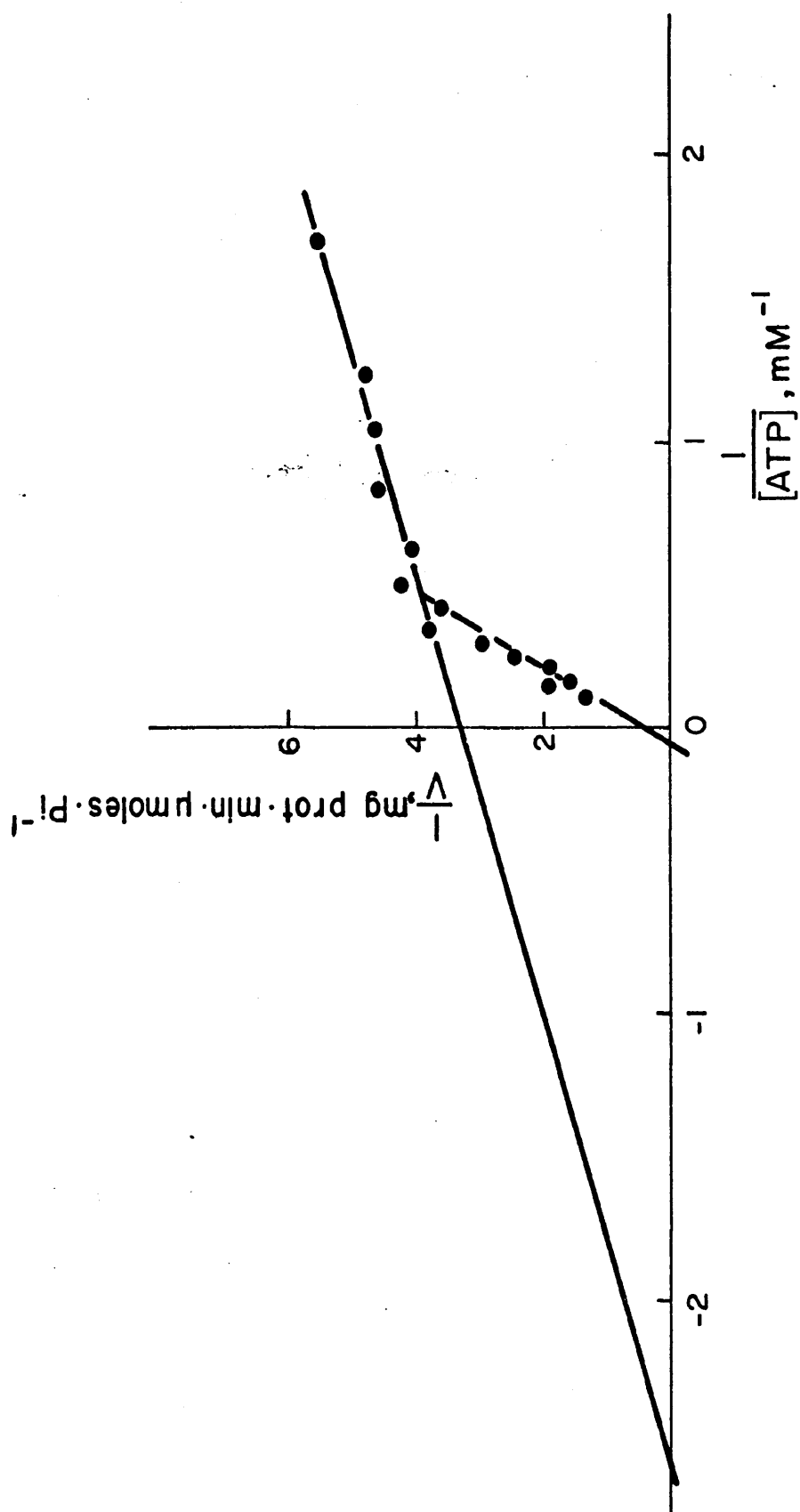


Fig. 34 - Representación doblemente recíproca de los datos de la Fig. anterior. Otros detalles se encuentran en el texto.

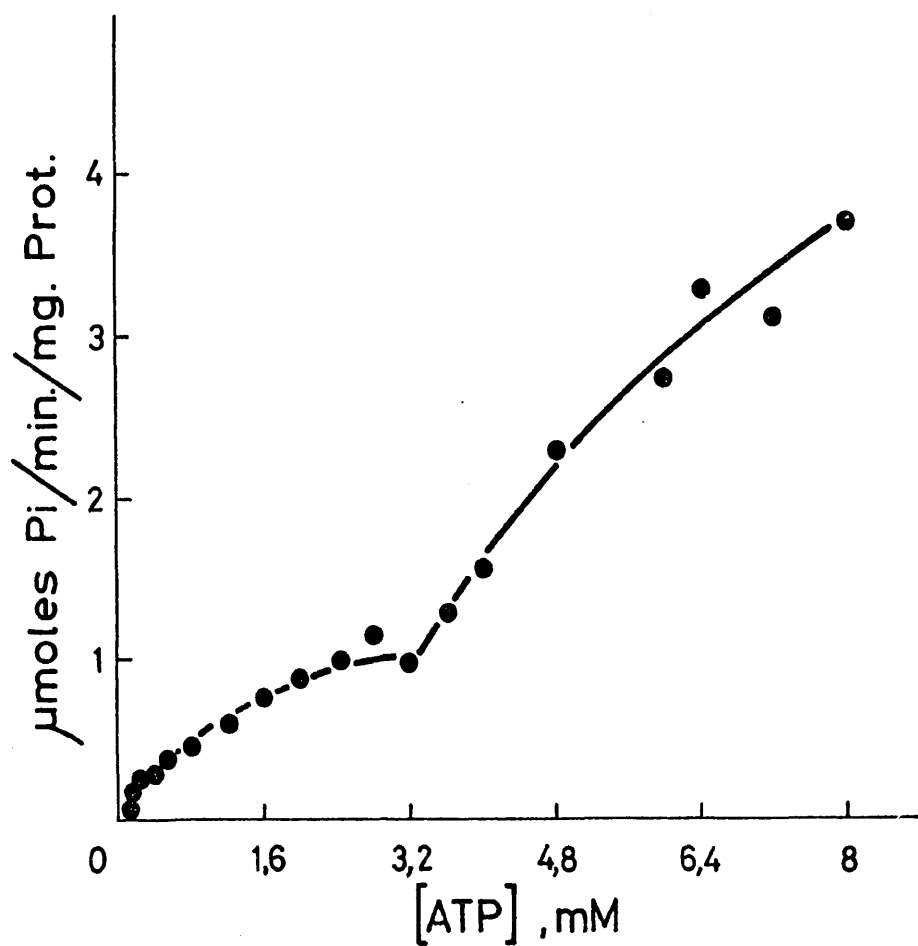


Fig. 35 - Curva de saturación de ATP para ATPasa soluble. La enzima fué solubilizada con EDTA 3 mM en Tris 50 mM, pH 9. La concentración de Mg^{2+} no se alteró en toda la experiencia (4 mM). Las actividades enzimáticas se determinaron por colorimetría y radioactividad.

bajas concentraciones de ATP y 17 mM para las concentraciones superiores. Las V_{ms} correspondientes son aproximadamente 0.3 y 2.5.

Todo parece indicar que la ATPasa de E.coli tiene dos sitios o dos grupos de sitios con afinidades distintas para el ATP.

La Fig. 35 presenta una experiencia similar efectuada con la ATPasa solubilizada con EDTA 3 mM Tris 50 mM, pH 9. La saturación de la enzima con ATP, a concentración constante de Mg^{2+} , da lugar a dos curvas, una a bajas y otra a altas concentraciones de ATP. Los parámetros calculados en la Fig. 36 arrojan unos valores para los K_{ms} de 1.4 mM y 20 mM y para los V_{mx} de 1.4 y 10 según se trate de la curva correspondiente a las concentraciones inferiores de ATP o a las más elevadas.

Nuevamente nos encontramos con que la ATPasa es capaz de fijar ATP con dos tipos bastante diferentes de afinidad, tal como se desprende de la cinética de velocidades iniciales.

Los valores de la K_m más pequeña están de acuerdo con los hallados para esta misma enzima por otros investigadores (111,112) utilizando bajas concentraciones de sustrato. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos con Mg^{2+}/ATP en relación 1/2, nunca mostraron esta cinética compleja, a pesar de que utilizábamos las mismas concentraciones de ATP que en estas experiencias. Entonces los K_{ms} eran superiores a éstas, si bien inferiores a las halladas ahora para altas

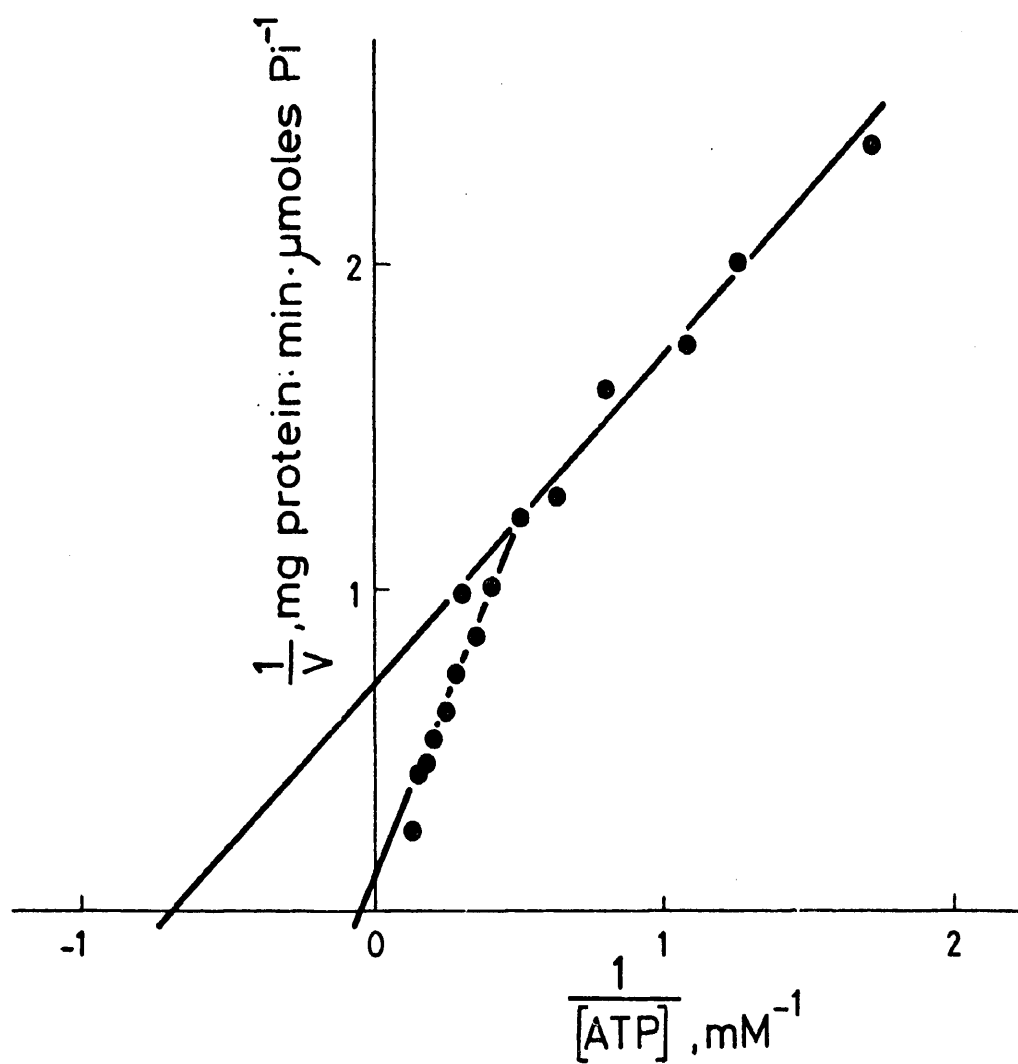


Fig. 36 - Representación de Lineweaver de los datos de la Fig. 35.

Los parámetros y otros detalles se encuentra en el texto.

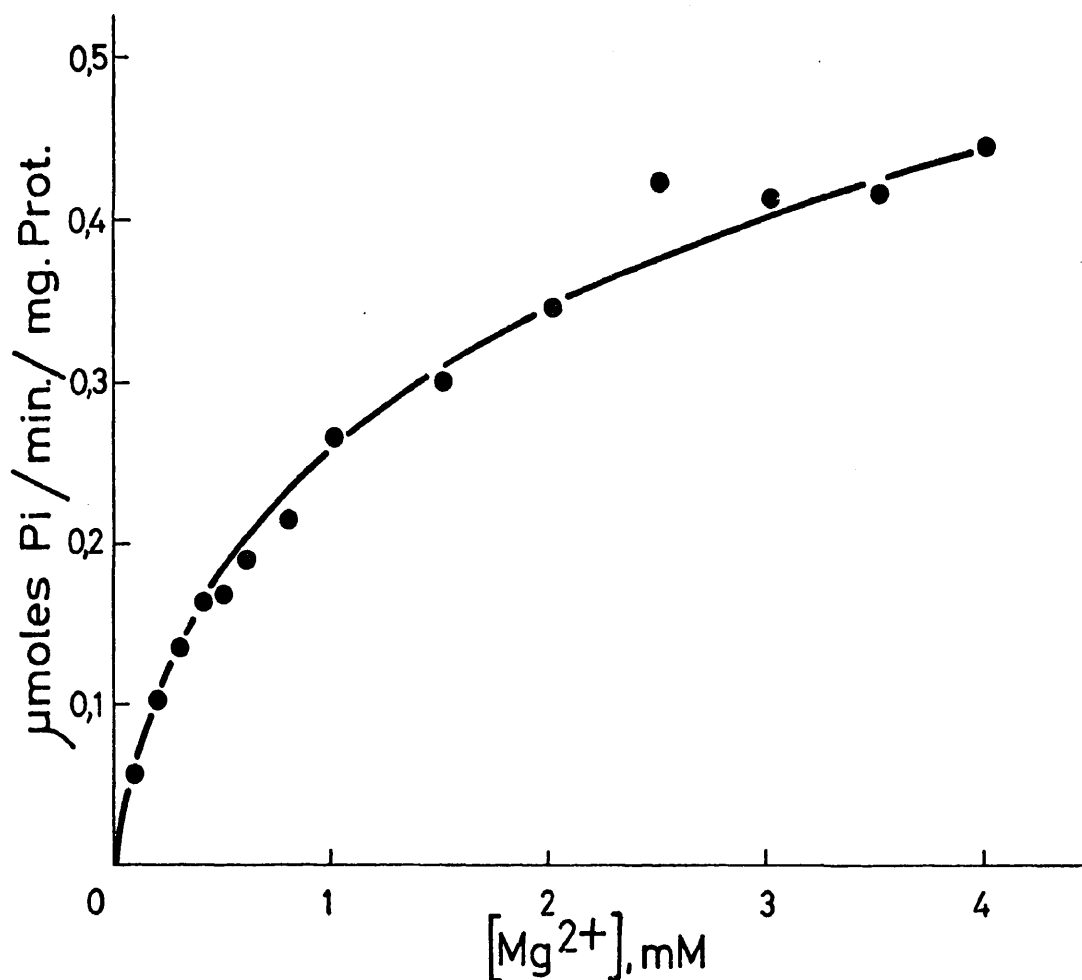


Fig. 37 - Saturación de Mg^{2+} de la ATPasa asociada a la membrana en ausencia de tripsina. Las actividades fueron determinadas por métodos colorimétricos y radioactivos. La concentración de ATP se conservó igual a 8 mM.

concentraciones de ATP, lo que podría indicar que allí estábamos midiendo una media de los valores aquí encontrados.

El significado de esta diferencia puede radicar en la existencia de sitios específicos para el ATP y el Mg^{2+} que no son coincidentes. El Mg^{2+} tendría sus sitios de fijación e influirían en la fijación del ATP en su hidrólisis o en ambas, a través de una interacción indirecta mediada por la misma enzima. Esta interpretación viene corroborada por la evidencia de que la ATPasa se vuelve más sensible a la digestión por la tripsina cuando se halla en presencia de Mg^{2+} que en ausencia.

Una consecuencia de esta interpretación es que parece difícil sostener que el verdadero sustrato de la ATPasa sea el complejo $Mg\text{-}ATP$, como se ha afirmado muchas veces (175, 176), al menos en el caso de la ATPasa de E.coli.

Cinética de saturación de Mg^{2+}

Para completar estas experiencias parecía lógico estudiar la saturación de Mg^{2+} en presencia de concentraciones constantes de ATP. La concentración de ATP fué elegida, como en el caso de Mg^{2+} tal que correspondiera al sustrato óptimo cuando la relación Mg^{2+}/ATP se mantenía invariable, es decir 8 mM. La Fig. 37 muestra la curva de saturación de Mg^{2+} para la ATPasa asociada a membrana, ensayada sin tripsina en el medio de reacción, y la Fig. 38 representa la misma experiencia realizada en presencia de tripsina. Ambas represen

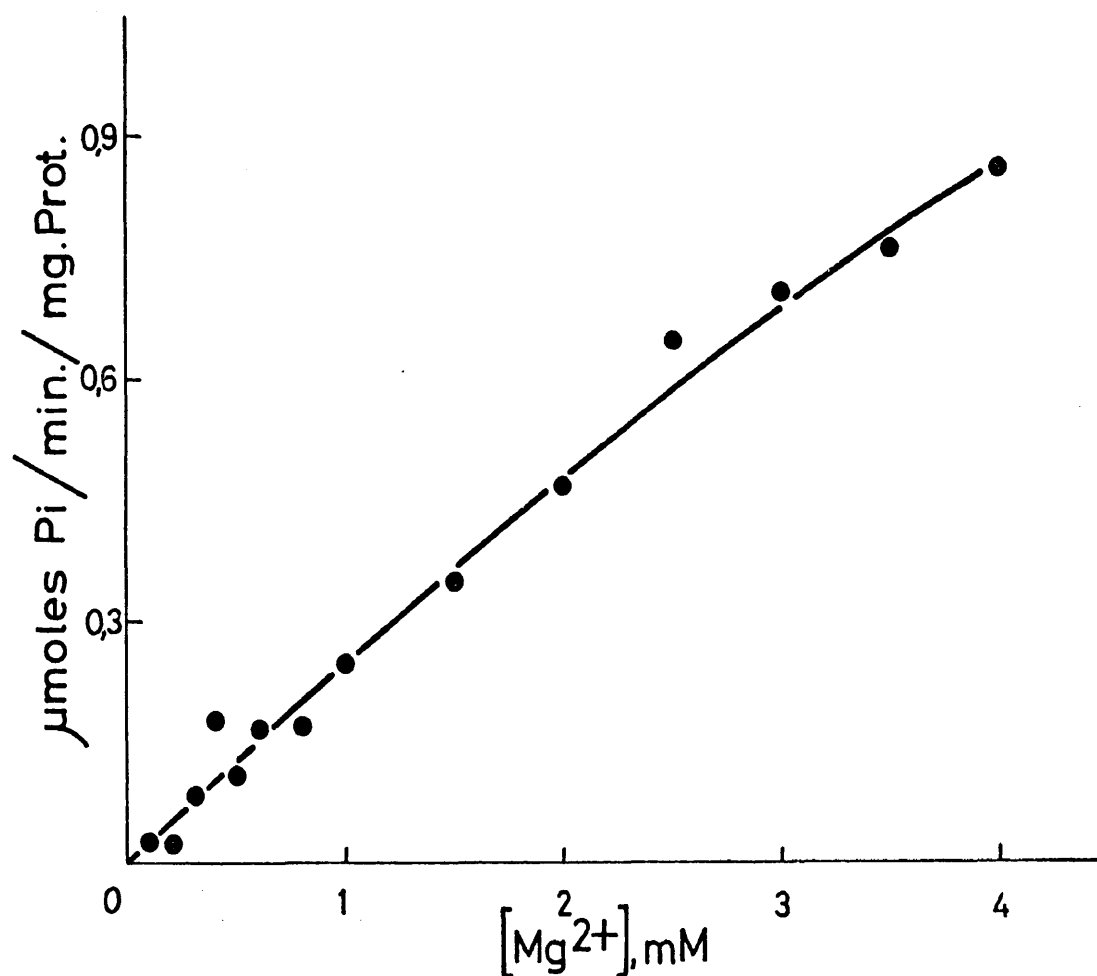


Fig. 38 -Curva de saturación de Mg^{2+} de la ATPasa ligada a la membrana, realizada en presencia de tripsina. La concentración de ATP fué 8 mM, y la actividad enzimática ensayada por colorimetría y radioactividad.

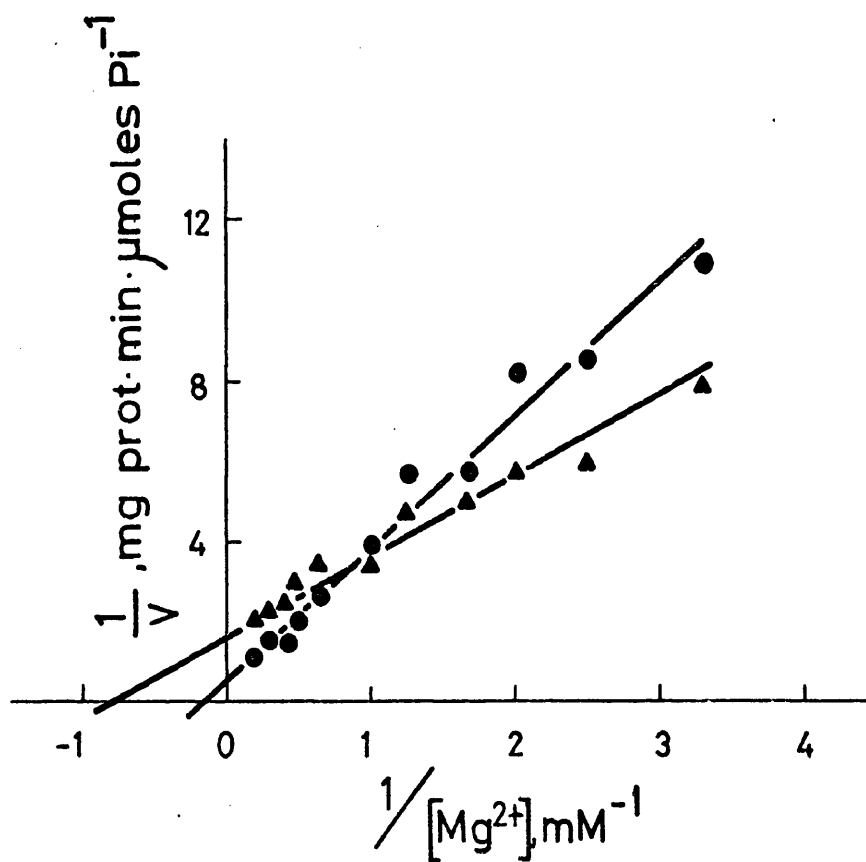


Fig. 39 - Representación de Lineweaver de los datos presentados en las Figs. 37 y 38. ●-● Actividad ensayada con tripsina; ▲-▲ actividad medida sin tripsina.

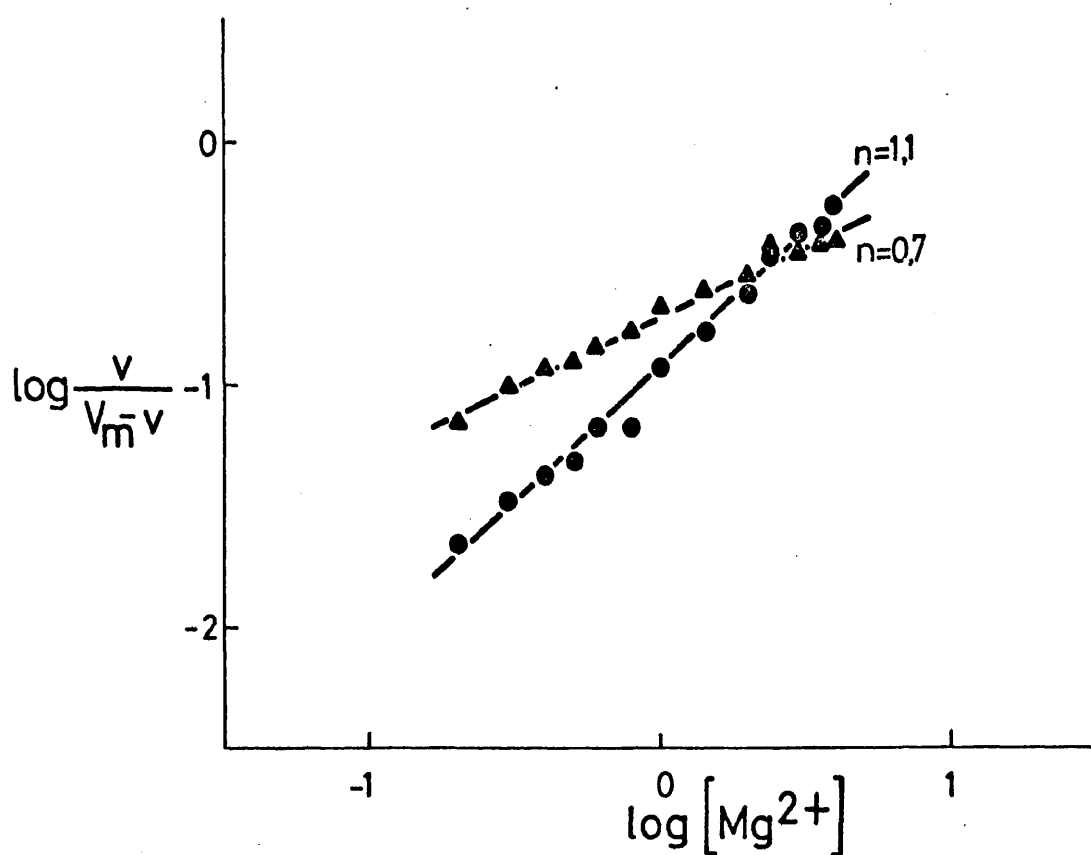


Fig. 40 - Coeficientes de Hill obtenidos con los resultados de las Figs. 37 y 38. ●-● Experiencia realizada en presencia de tripsina; ▲-▲ experiencia hecha en ausencia de tripsina.

taciones manifiestan una notable diferencia en cuanto a la velocidad de la reacción, pero la forma de las curvas es idéntica y sensiblemente diversa de las curvas de saturación del ATP.

La representación doblemente recíproca de estos datos se puede ver en la Fig. 39. A diferencia de los resultados anteriores nos encontramos con que la presencia de tripsina en el medio de reacción incrementa no sólo la V_m sino también la K_m . Los valores obtenidos en ausencia de tripsina son de $K_m = 1.2$ mM y $V_m = 0.6$, mientras que estos mismos parámetros determinados cuando se puso tripsina en el medio de reacción son $K_m = 7$ mM y $V_m = 8$.

La Fig. 40 nos muestra la representación logarítmica de una fracción de saturación de Mg^{2+} frente a concentraciones crecientes del mismo ligando. El coeficiente de Hill calculado de acuerdo con las rectas de la figura nos indica que la unión del Mg^{2+} a la enzima ligada a la membrana no es cooperativa. La diferencia de coeficientes introducida por la acción de la tripsina puede no ser significativa; o bien ser un reflejo real del efecto de la proteasa sobre la unión del catión a la enzima.

La Fig. 41 muestra la curva de saturación de Mg^{2+} para la ATPasa soluble cuando el ensayo de actividad se hizo sin tripsina, y la Fig. 42 representa la misma experiencia efectuada en presencia de tripsina. Ambas curvas tienen forma sigmoidal más pronunciada que la obtenida con Mg^{2+} /ATP en relación 1/2. Es de notar que en

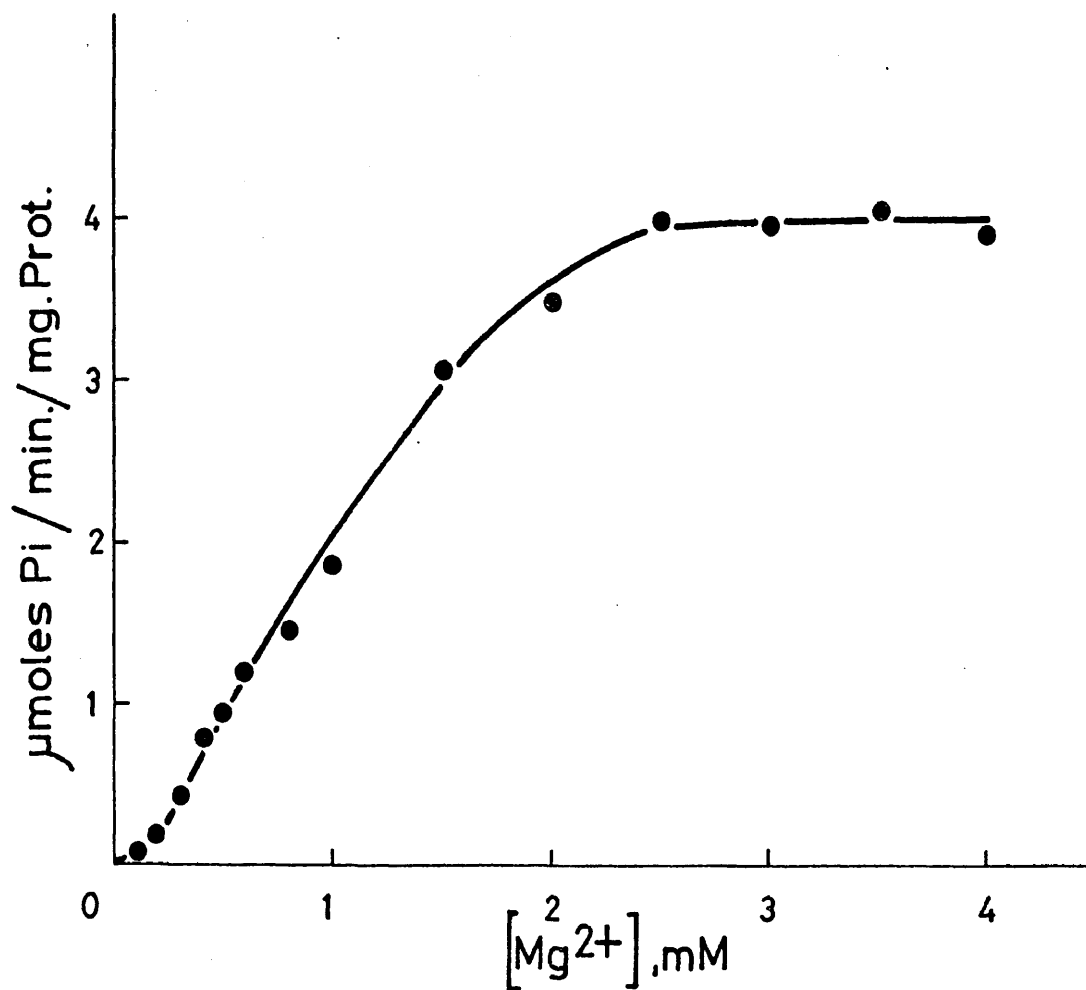


Fig. 41 - Saturación de Mg^{2+} de la ATPasa soluble. Las actividades fueron ensayadas por colorimetría y radioactividad, siempre en ausencia de tripsina. La concentración de ATP fué 8 mM.

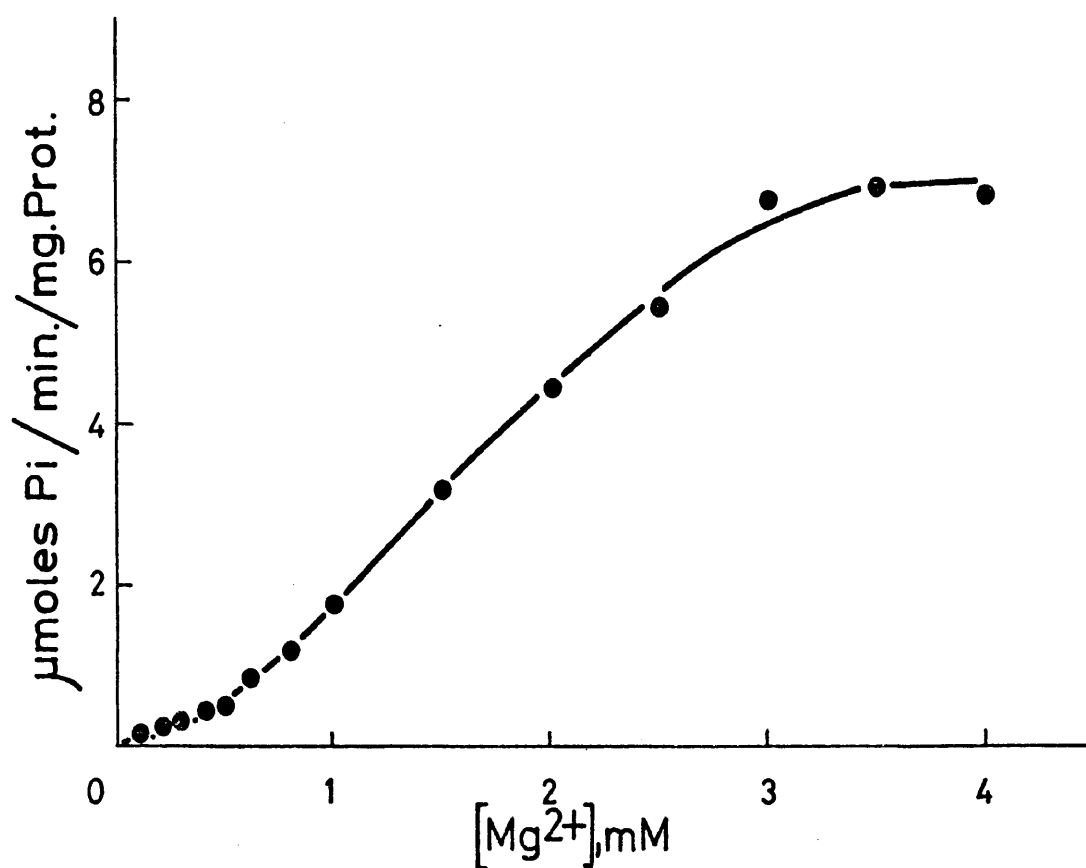


Fig. 42 - Saturación de Mg^{2+} de la ATPasa soluble. Las actividades fueron ensayadas en presencia de tripsina y por dos técnicas al igual que las anteriores. .

estos dos experimentos la concentración de ATP fué 8 mM en todas las muestras.

La representación de Lineweaver de estos datos, Fig. 43, da lugar a dos curvas. Su prolongación permite calcular aproximadamente los parámetros cinéticos cuyos valores son $K_m = 1.1$ mM y $V_m = 5.5$ para los resultados con la actividad básica, y $K_m = 2$ mM y $V_m = 10$ cuando la actividad fué determinada con tripsina en el medio de reacción. Al igual que en la enzima unida a la membrana nos encontramos con que los K_m s varían dependiendo de la acción de la tripsina.

Los coeficientes de Hill expresados en la Fig. 44, son indicativos de efectos cooperativos ya que en cualquier caso su valor es muy superior a la unidad.

Hemos sugerido en varias ocasiones la posibilidad de que el Magnesio se fije a la enzima en sitios distintos de los sitios del ATP. De acuerdo con los resultados que acabamos de presentar los sitios de fijación del Magnesio están además relacionados con la acción de la tripsina. La presencia del magnesio vuelve la ATPasa más sensible a la digestión trípica pero a su vez el efecto de la tripsina hace disminuir la afinidad de la ATPasa por el catión. Estas implicaciones mutuas sugieren por vez primera que el Mg^{2+} podría fijarse a una parte de la ATPasa que constituye el objeto directo de la proteasa, aunque esta interpretación no explique los requerimientos totales de catión que tiene la enzima.

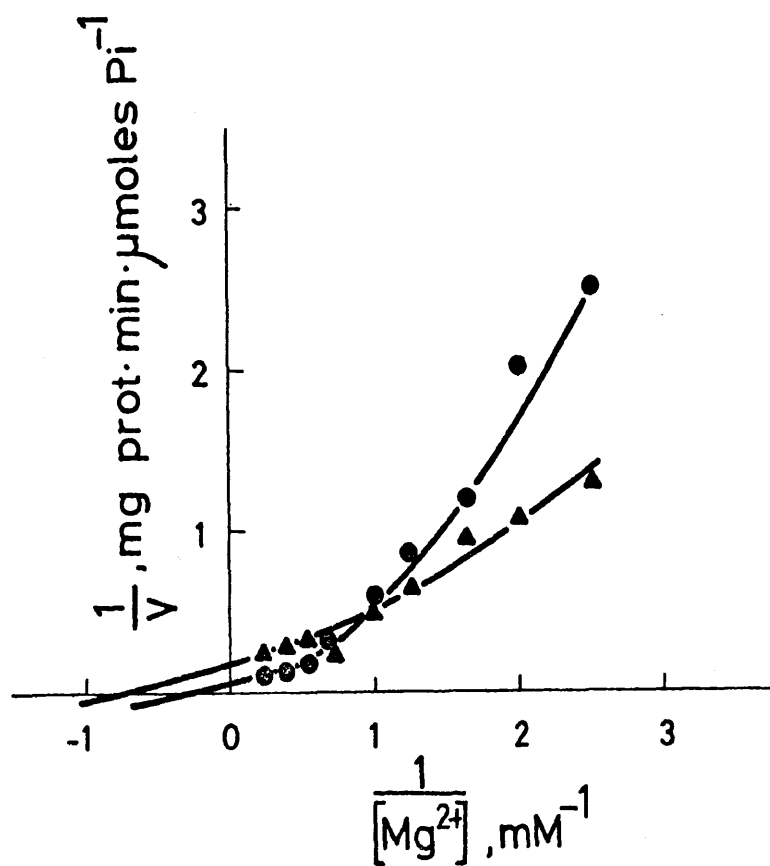


Fig. 43 - Representación doblemente recíproca de los datos contenidos en las Figs. 41 y 42. ●-● Las actividades fueron determinadas en presencia de tripsina. ▲-▲ Actividades en ausencia de tripsina.

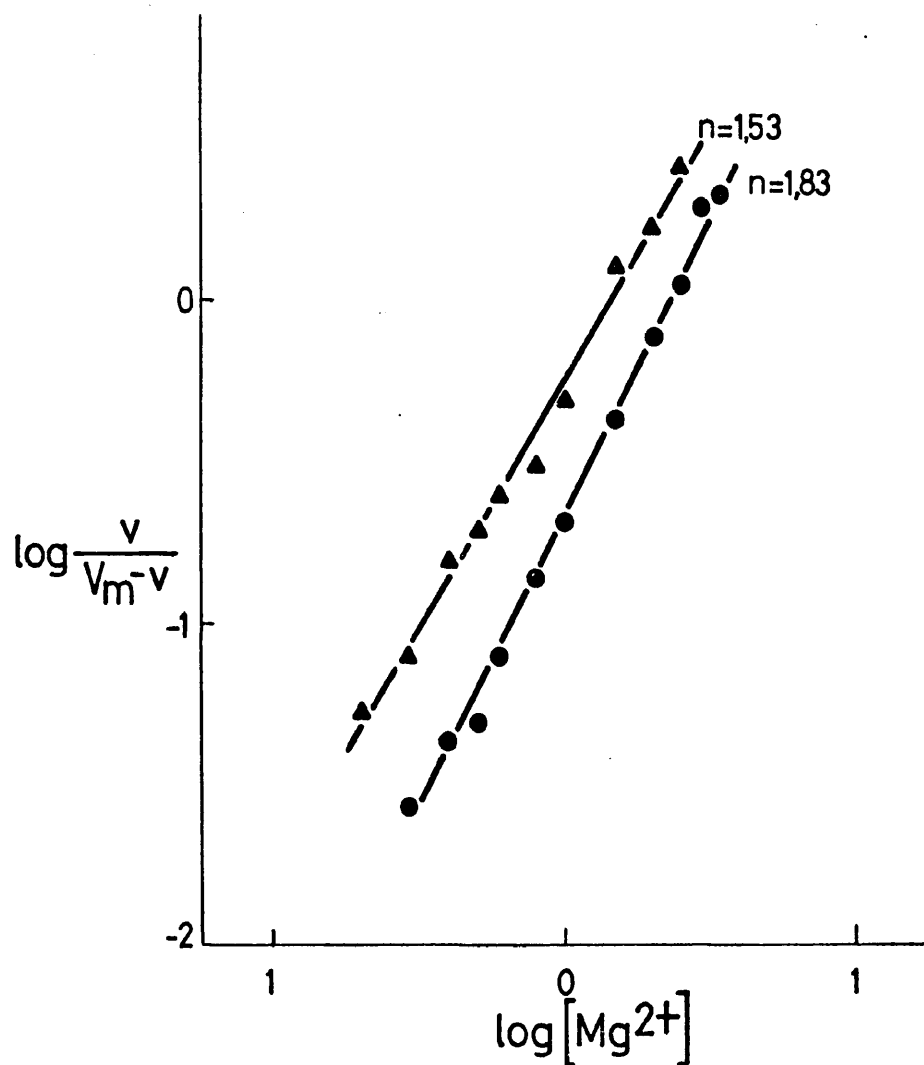


Fig. 44 - Representación logarítmica de fracciones de saturación de Mg^{2+} frente a concentraciones del mismo catión. Los coeficientes de Hill son 1.83 en presencia de tripsina ●-● ; y 1.53 en ausencia de la proteasa ▲-▲ . Los datos empleados en esta representación corresponden a los obtenidos en las Figs. 41 y 42.

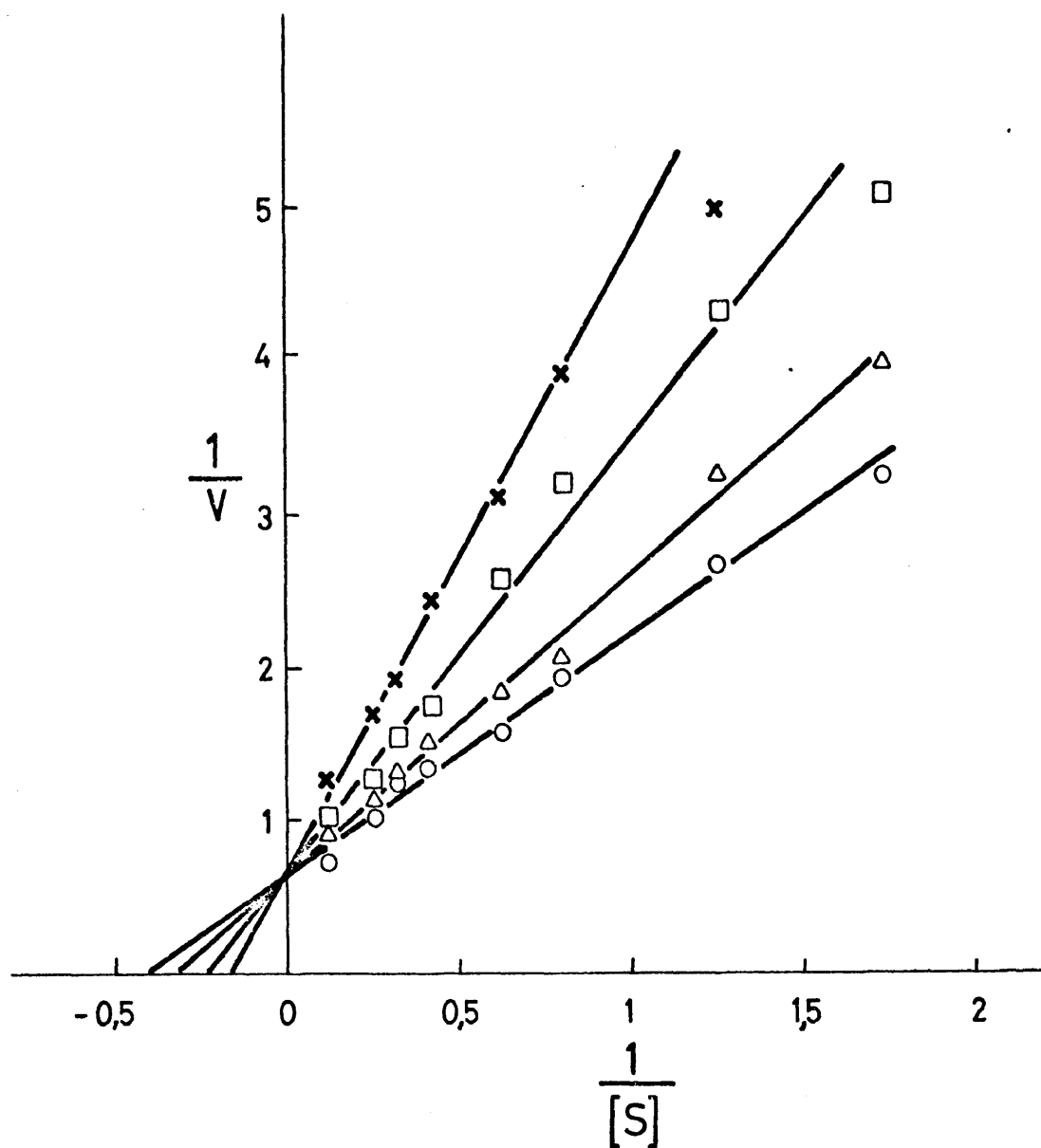


Fig. 45 - Inhibición por ADP de la ATPasa unida a membranas en ausencia de tripsina. Los datos han sido obtenidos representando inversos de velocidades iniciales frente a inversos de concentraciones de sustrato, a distintas concentraciones constantes de ADP. ○-○ sin ADP; Δ-Δ ADP 0,4 mM; ◻-◻ ADP 1,2 mM; ×-× ADP 2,4 mM. Las demás condiciones de ensayo como están descritas en Métodos.

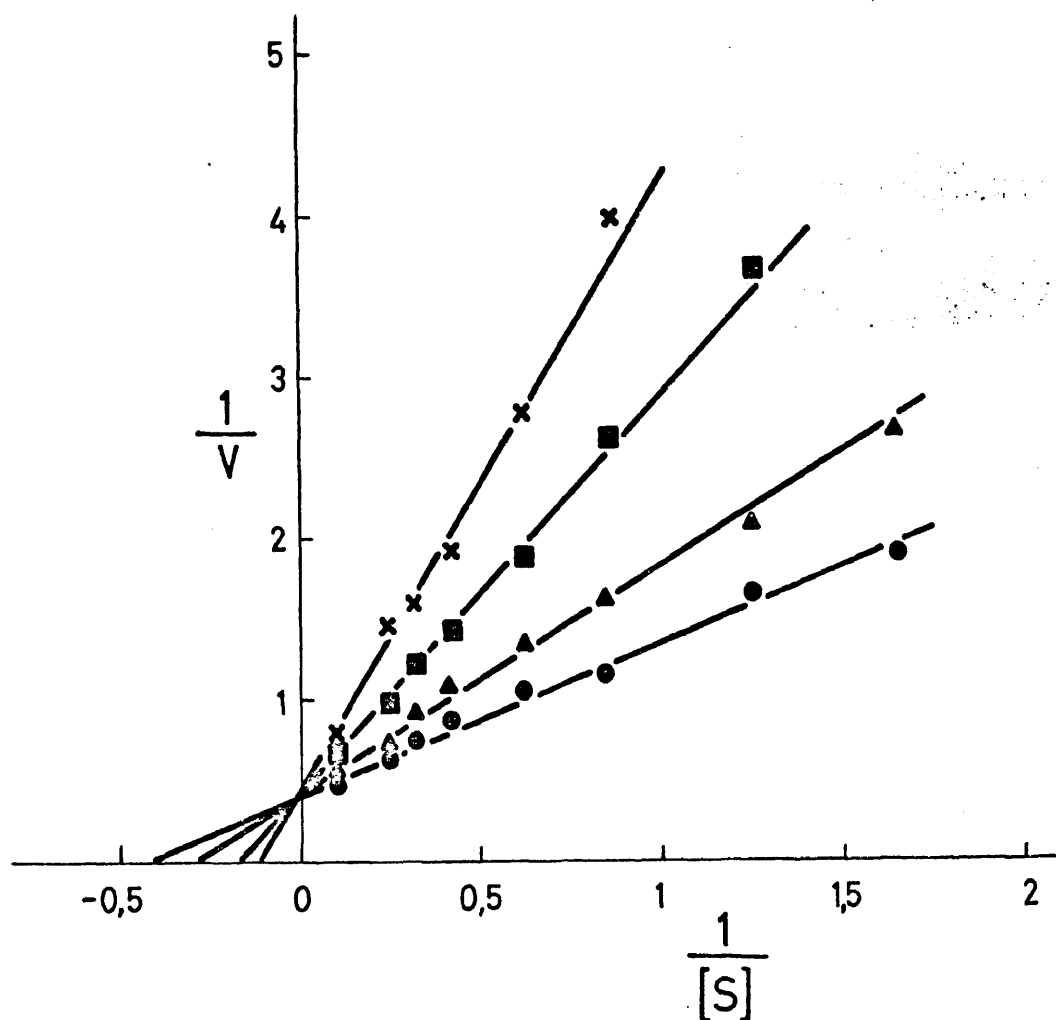


Fig. 46 - Inhibición por ADP de la ATPasa unida a membranas en presencia de tripsina. ●-● Sin ADP; ▲-▲ ADP 0,4 mM; ■-■ ADP 1,2 mM; x-x ADP 2,4 mM. Las representaciones doblemente recíprocas están efectuadas como se indica en la Fig. anterior.

Inhibición de ATPasa de *E. coli* por ADP y Pi.

La inhibición de la ATPasa por el ADP, uno de los productos finales de reacción, ha sido ya estudiada en ATPasa mitocondrial (185) y algunas ATPasas bacterianas (167, 168).

La Fig. 45 muestra la representación doblemente recíproca de velocidades iniciales y concentraciones de sustrato, para concentraciones fijas de ADP en ausencia de tripsina en el medio de reacción, y la Fig. 46 presenta las mismas experiencias realizadas en presencia de tripsina. En las dos figuras se estudia inhibición por ADP de la ATPasa asociada a la membrana. En ambos casos las cuatro representaciones de Lineweaver se cortan en un punto del eje de ordenadas, indicando que el ADP actúa como un inhibidor competitivo; y en ambos casos la K_m se incrementa al tiempo que lo hace la concentración del inhibidor. Como consecuencia de este tipo de inhibición los V_{ms} no se alteran en función de la cantidad de ADP. Toda inhibición de carácter competitivo llega a eliminarse cuando se incrementa convenientemente la concentración de sustrato. Esto explica la no variación de los V_{ms} . Sin embargo la actividad ensayada en presencia de tripsina conserva una V_m superior a la de la actividad basal, como efecto de la misma tripsina.

Las Figs. 47 y 48 expresan la inhibición de la ATPasa soluble por el ADP, sin tripsina en el medio de ensayo y con ella respectivamente. Las representaciones doblemente recíprocas para concen

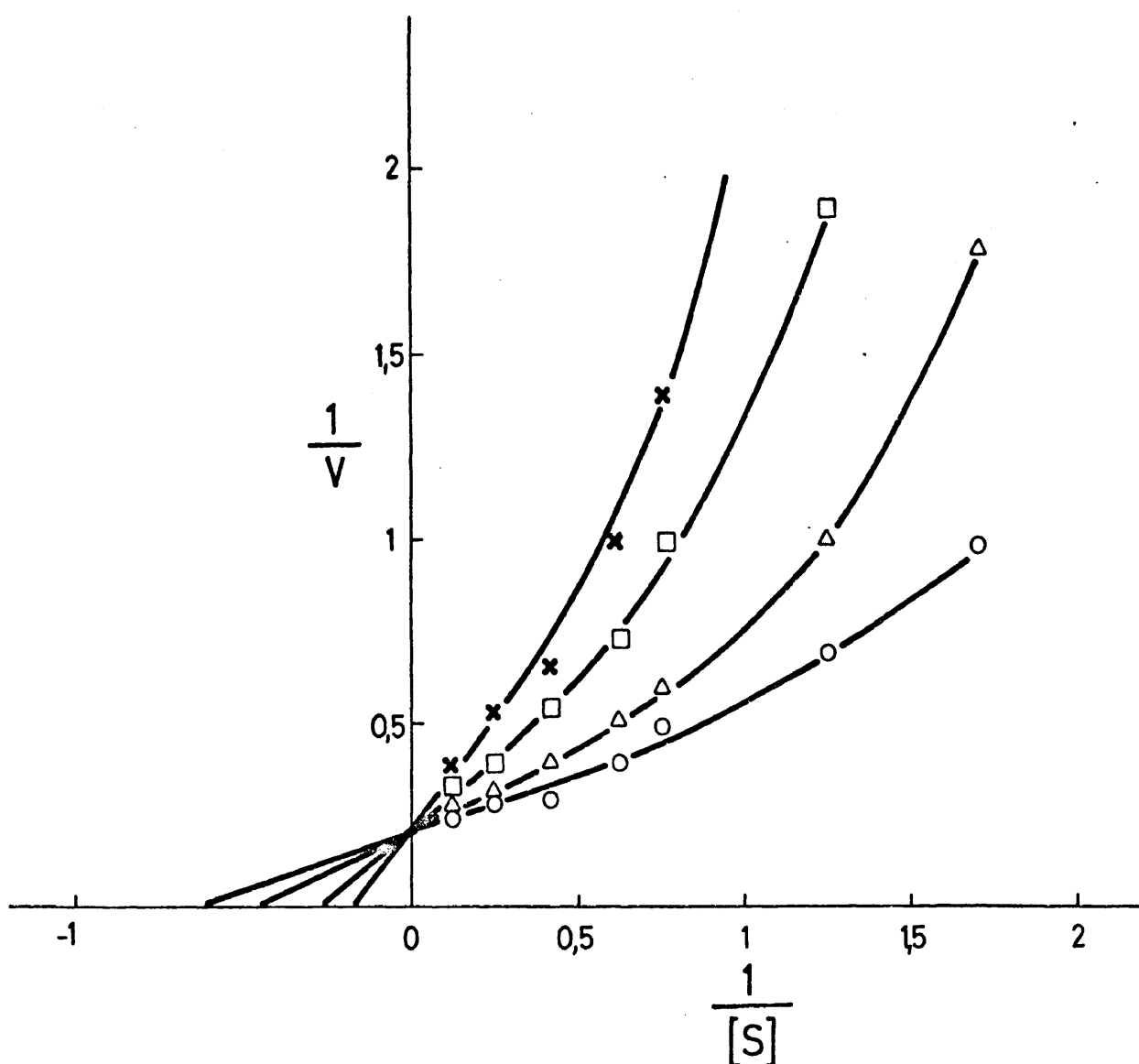


Fig. 47 - Inhibición por ADP de la ATPasa soluble en ausencia de tripsina. Las curvas fueron obtenidas representando inversos de velocidades iniciales frente a inversos de concentraciones de sustrato, a diversas concentraciones de inhibidor. ○-○ Sin ADP; Δ-Δ ADP 0,4 mM; ◻-◻ ADP 1,2 mM; ×-× ADP 2,4 mM. Otras condiciones de ensayo se encuentra en Materiales y Métodos.

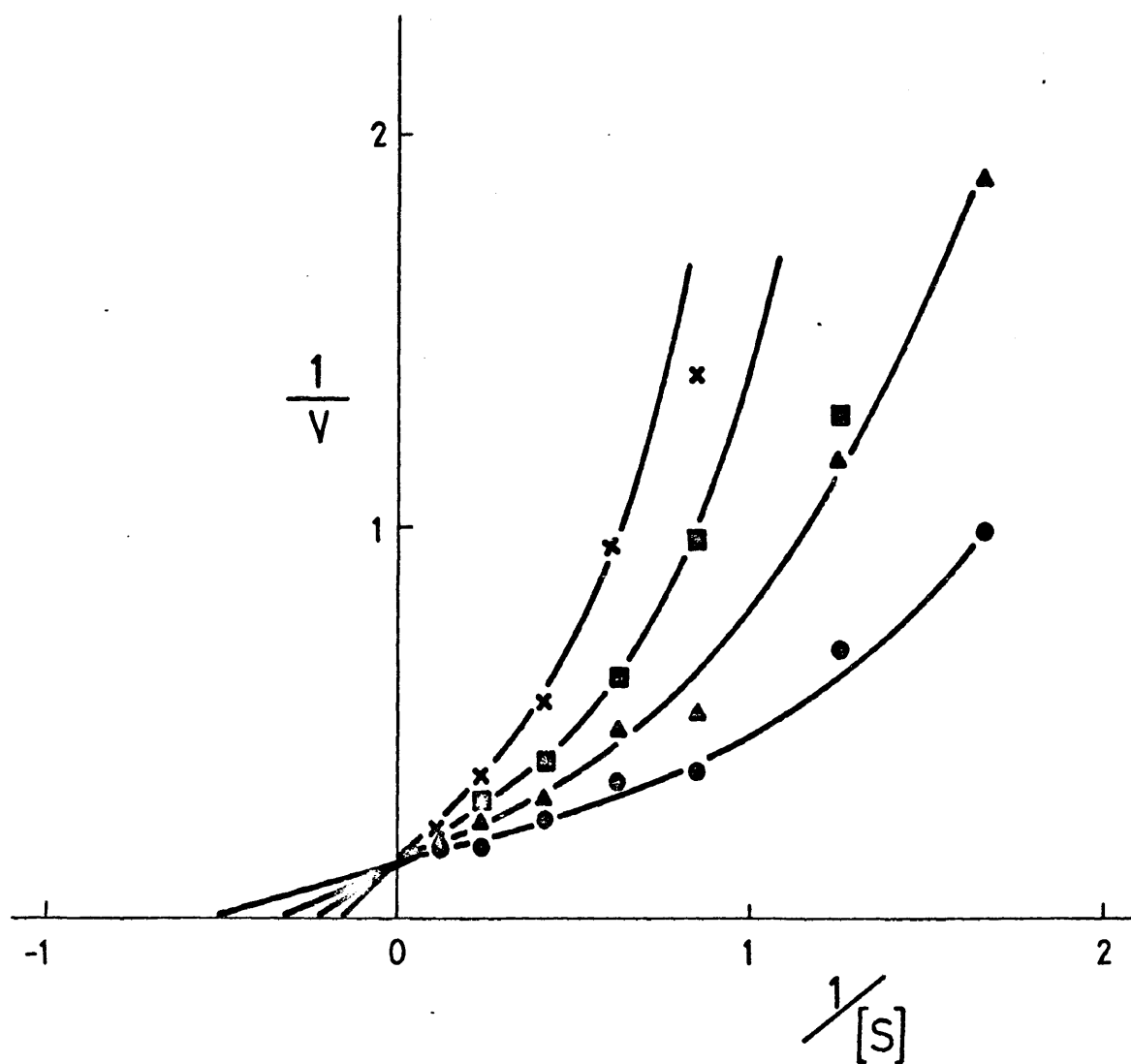


Fig. 48 - Inhibición por ADP de la ATPasa soluble ensayada en presencia de tripsina. Los datos fueron obtenidos como en la Fig. anterior. Las concentraciones de ADP son las siguientes: ●-● sin ADP; ▲-▲ ADP 0,4 mM; ■-■ ADP 1,2 mM; x-x ADP 2,4 mM.

traciones fijas de inhibidor se cortan en un punto sobre el eje de ordenadas. Pero se ha de tener en cuenta que las curvas directas de saturación de sustrato para la enzima al estado soluble son de forma sigmoide. Esto implica que las representaciones de Lineweaver no son rectas, sino curvas con la concavidad hacia arriba. Su extrapolación permite encontrar un punto donde se crucen, que nos indicará el tipo de inhibidor de que se trata, y este punto creemos que ha sido válidamente situado en el eje de abscisas. En consecuencia el ADP actúa, desde este punto de vista, como un inhibidor competitivo para la ATPasa soluble no siendo influenciado por la presencia o ausencia de tripsina. Las K_m s son más grandes cuanto mayor es la cantidad de inhibidor que se añade al medio de reacción, mientras que las V_m s se mantienen inalteradas.

Los resultados expuestos en las cuatro figuras anteriores inducen a suponer que el ADP es un inhibidor competitivo de la ATPasa de E. coli tanto si se encuentra asociada a membrana como en su forma soluble, y su semejanza estructural con el sustrato confirma esta suposición.

El mecanismo de todo inhibidor competitivo es conocido. El inhibidor se fija al sitio activo ocupando el lugar de sustrato y compitiendo con él por la enzima. La enzima formará un complejo ya con el sustrato ya con el inhibidor, pero normalmente no con los dos, salvo en el caso de inhibición parcialmente competitiva o competitiva hiperbólica (188)

que como veremos más tarde no tiene lugar aquí. Por tanto el ADP compite con el ATP por el sitio catalítico de la ATPasa formándose complejos ATPasa-ATP o ATPasa-ADP. La preponderancia de uno o de otro dependerá de las concentraciones de inhibidor y sustrato y de las afinidades de cada uno por la enzima. El complejo ATPasa-ATP se rompe en productos finales a la misma velocidad que si el ADP no estuviera presente, lo que se refleja en la V_m que no cambia. El complejo enzima-inhibidor presenta dos posibilidades; una es que sea completamente incapaz de transformarse en enzima libre y producto finales de reacción, al que ha denominado Mahler (189) de "vía muerta" y otra se basa en el hecho que se transforma en productos finales pero a menor velocidad que el sustrato. Dada la semejanza estructural del ADP con el ATP podemos pensar que el ADP no cae dentro del grupo de inhibidores de "vía muerta" pero su velocidad de hidrólisis en condiciones normales es indetectable.

Nuestras conclusiones concuerdan en general, con estudios de inhibición por ADP realizados en otras ATPasas. La ATPasa mitocondrial (185) es inhibida de forma competitiva por el ADP en su estado soluble y unida a la membrana, con una K_i 30 y 80 μM respectivamente. ATPasas bacterianas como la de Streptococcus faecalis (168) y Bacillus megaterium (167) y E. coli son también inhibidos competitivamente por el ADP. Sin embargo Nelson y col (186) han postulado para la ATPasa de Cloroplastos otro mecanismo de inhibición. La curva de saturación del ATP cambia de su forma hiperbólica a una forma sig

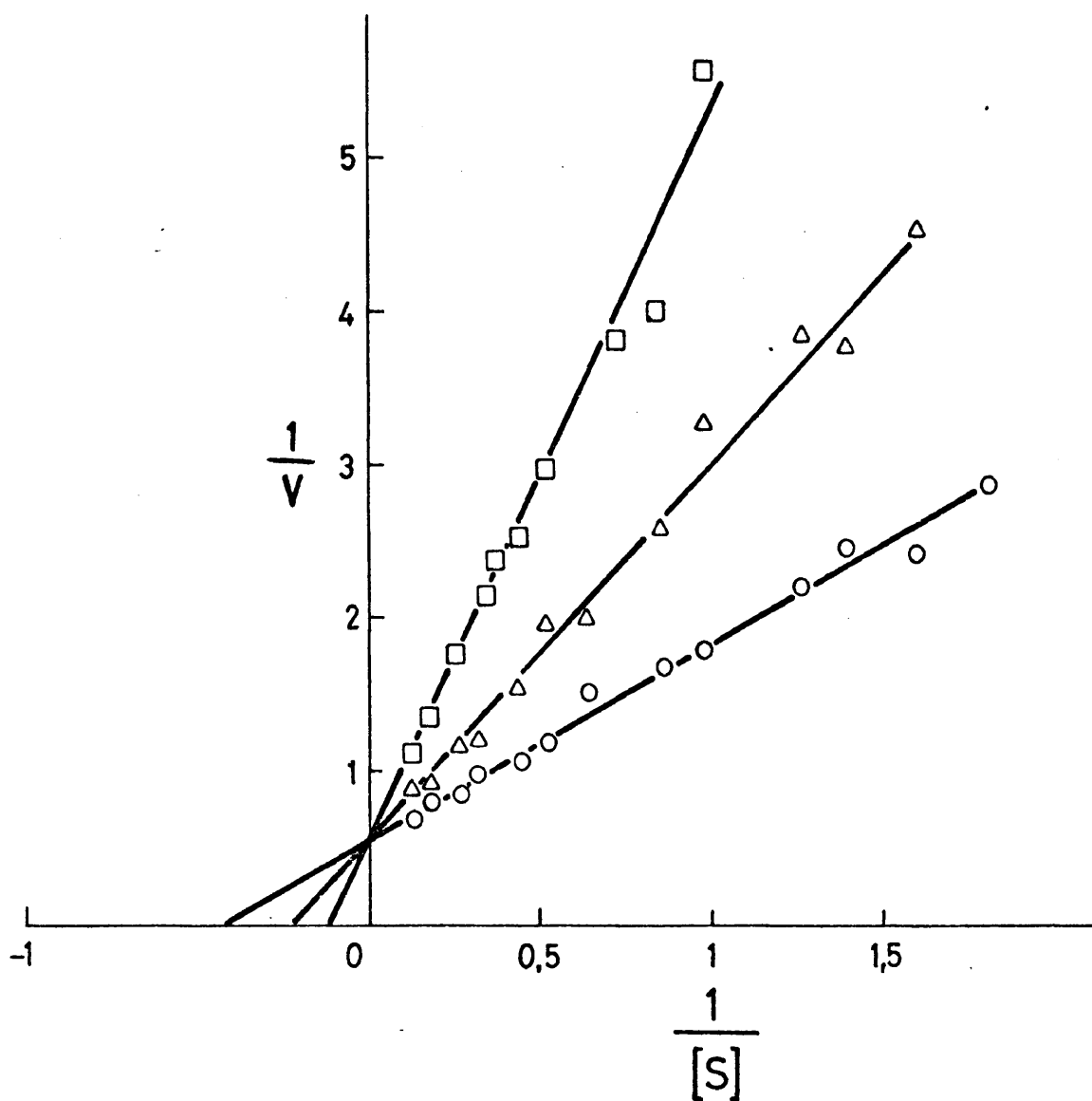


Fig. 49 - Inhibición de ATPasa unida a membranas por el P_i . Los resultados fueron obtenidos en ausencia de tripsina. Se representan los inversos de velocidades iniciales frente a los inversos de concentraciones de sustrato, a concentraciones de P_i 2 y 4 mM. Las demás condiciones se han descrito en Materiales y Métodos. ○-○ sin P_i ; Δ-Δ P_i 2 mM; □-□ P_i 4 mM.

moide en presencia de ADP. Además tanto la K_m como la V_m se ven alteradas por efecto del inhibidor, y el orden de reacción es dos veces superior en presencia de ADP que en su ausencia. Roisin y col.(112) han encontrado algo semejante en la ATPasa de E.coli; la curva de saturación de sustrato se vuelve más y más sigmoide en presencia de concentraciones crecientes de ADP, dando lugar a una inhibición más compleja acompañada de cambios en la K_m y V_m .

A pesar de estas divergencias, creemos que nuestros resultados dentro del marco de condiciones en que fueron obtenidos, solo pueden interpretarse como debidos a una inhibición competitiva producida por el ADP.

La Fig. 49 presenta la inhibición de la ATPasa unida a membranas por el P_i , en ausencia de tripsina. Los resultados indican un tipo de inhibición competitiva al igual que el producido por el otro producto final de la reacción. Las gráficas se cortan sobre el eje de ordenadas y el valor de la constante de inhibición se aproxima a 2 mM, aun cuando esta K_i no ha sido obtenida muy exactamente. La determinación colcrimétrica de la actividad enzimática, que utilizamos en estas experiencias, tenía fondos de fosfato libre muy elevados, como efecto de haber sido utilizado el P_i como inhibidor. Estos fondos restan precisión y sensibilidad a nuestra medidas, por lo que ofrecemos resultados como una indicación del comportamiento inhibidor del P_i , sin que podamos dar gran valor a los parámetros calculados.

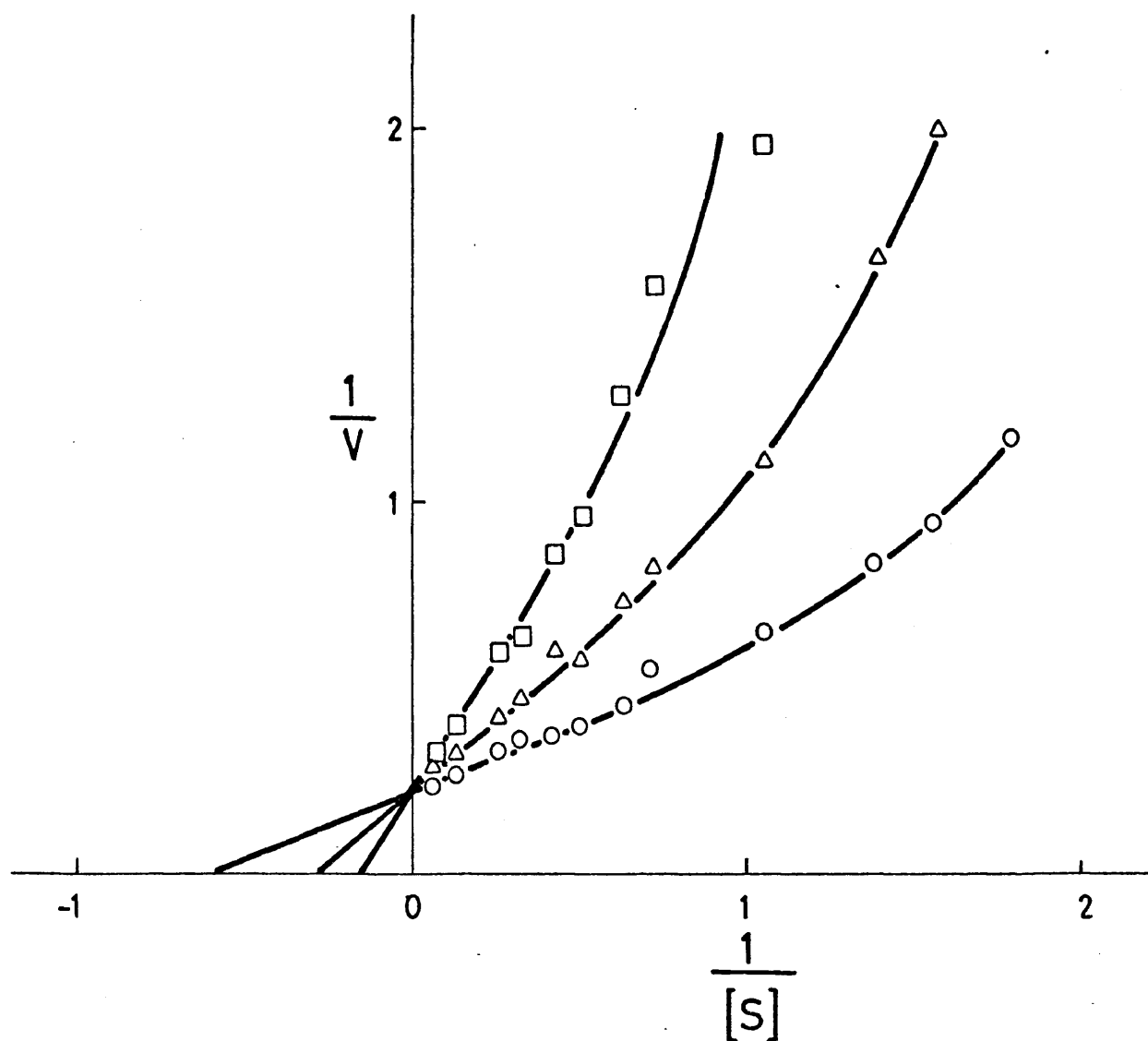


Fig. 50 - Efecto inhibitor del Pi sobre la ATPasa soluble en ausencia de Tripsina. Las representaciones de Lineweaver están hechas como en la Fig. anterior. Las concentraciones de Pi son las siguientes: $\circ - \circ$ sin Pi ; $\Delta - \Delta$ Pi 2 mM; $\square - \square$ Pi 4 mM.

La Fig. 50 muestra el efecto inhibitor del P_i sobre la ATPasa soluble de E.coli en ausencia de tripsina. Las mismas dificultades resaltadas en el párrafo anterior se han encontrado aquí, pero incrementadas con el tipo de curvas que se obtienen con la fracción soluble al representar inversos de velocidades iniciales frente a inversos de concentraciones de sustrato. La extrapolación de estas curvas no da seguridad en el cálculo de las K_m y en consecuencia tampoco al de la constante de inhibición. Sin embargo una aproximación de estos valores ha dado como resultado una K_i de 1.8 a 2 mM. Tanto para la ATPasa unida a la membrana como para la soluble, las constantes de inhibición del P_i parecen ser ligeramente superiores a las del ADP. Estos hallazgos estarían muy en consonancia con las distintas estructuras moleculares de ambos inhibidores. El ADP por su semejanza con el ATP, parece lógico pensar que se fije al centro activo con mayor afinidad que el P_i , ya que pudiera utilizar los mismos restos de especificidad que el ATP. La diferencia de afinidad entre el ATP y el ADP podría deberse, en todo caso, a impedimentos de tipo estérico.

En conclusión creemos que se puede afirmar que el P_i se manifiesta en nuestras condiciones de ensayo como un inhibidor competitivo de la ATPasa, tanto en su estado de asociado a la membrana como en su forma soluble.

Resultados semejantes han sido encontrados por Schnebli y col. (170) con ATPasa purificada de Streptococcus faecalis. El P_i al

igual que el ADP es inhibidor competitivo, si bien la constante de inhibición aducida por estos autores es notablemente superior a la nuestra. Con una K_i 0.7 mM para el ADP y 10 mM para el P_i Schnebli encuentra efectos sinérgicos de inhibición cuando ambos inhibidores se ponen simultáneamente en el medio de reacción.

En 1953 Dixon (187) ideó un método gráfico que permite calcular directamente las constantes de inhibición. Además de este notable adelanto, el método de Dixon presenta la ventaja de corroborar de forma casi inequívoca la catalogación de un inhibidor dentro del grupo de inhibidores competitivos o no competitivos y en cada uno de estos grupos su pertenencia al subgrupo de puros o parciales. El método consiste en representar inversos de velocidades iniciales frente a concentraciones crecientes de inhibidor para concentraciones fijas de sustrato. Representaciones de este tipo dan lugar a un haz de rectas que se cortan en un punto del segundo cuadrante, sobre el eje de las abscisas o en el tercer cuadrante. Inhibidores de tipo competitivo originan rectas que se cruzan en un punto del segundo cuadrante cuyas coordenadas son $(-K_i, 1/V_m)$. La proyección de este punto sobre el eje de abscisas nos da directamente K_i . Inhibiciones parcialmente competitivas dan lugar a un haz de rectas, pero sólo a bajas concentraciones de inhibidor. Si se incrementa éste las rectas se curvan hacia abajo originando hipérbolas, de donde el nombre de inhibición hiperbólica (188).

De acuerdo con estos principios un inhibidor es competitivo cuando la representación de Lineweaver da un haz de rectas para con

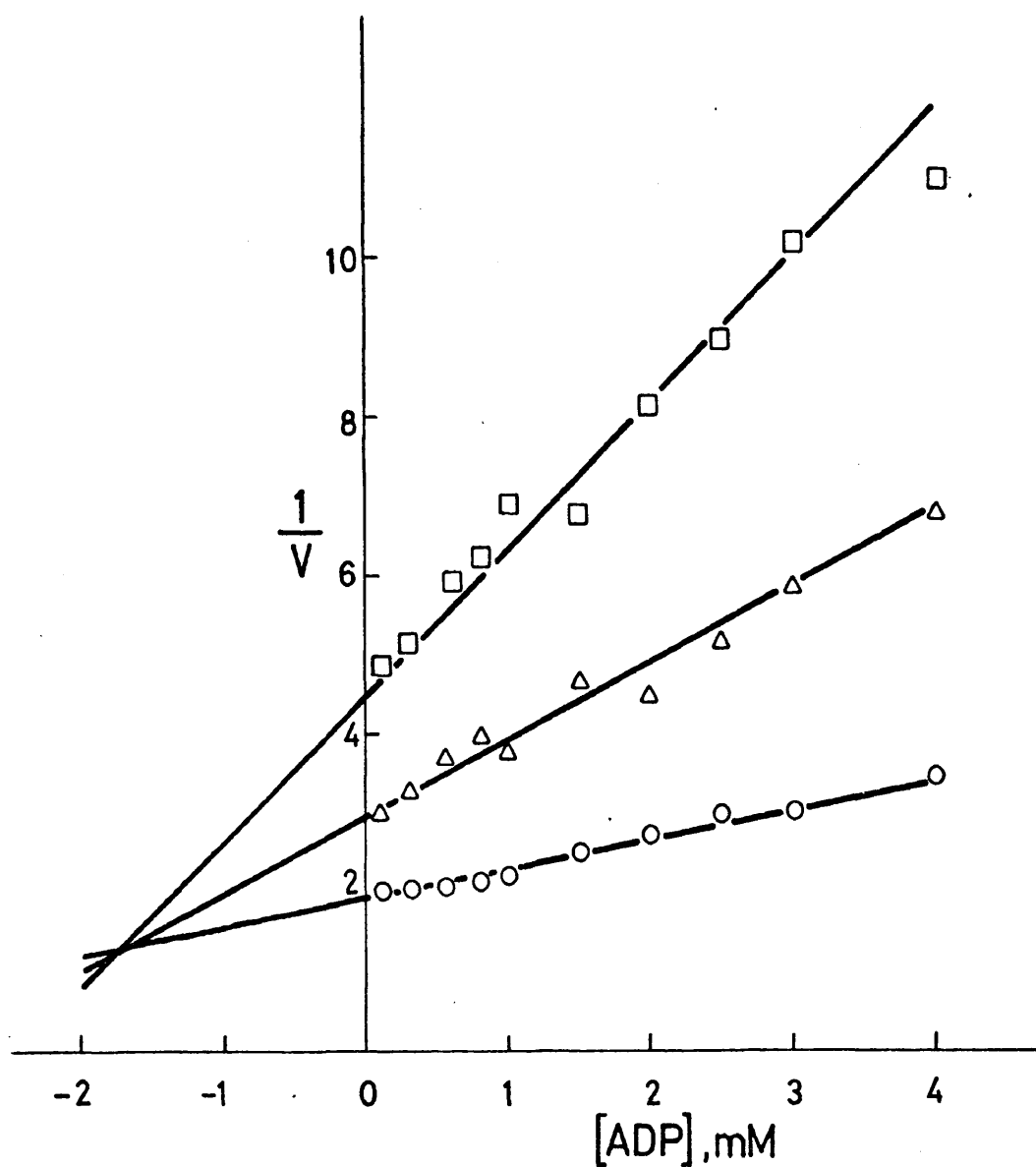


Fig. 51 - Inhibición de ATPasa unida a la membrana por ADP en ausencia de tripsina. Se representan inversos de velocidad inicial frente a concentraciones de ADP a concentraciones constantes de sustrato. ○-○ ATP 8 mM; Δ-Δ ATP 4,8 mM; □-□ ATP 1,6 mM. Restantes condiciones de ensayo como se indica en Materiales y Métodos.

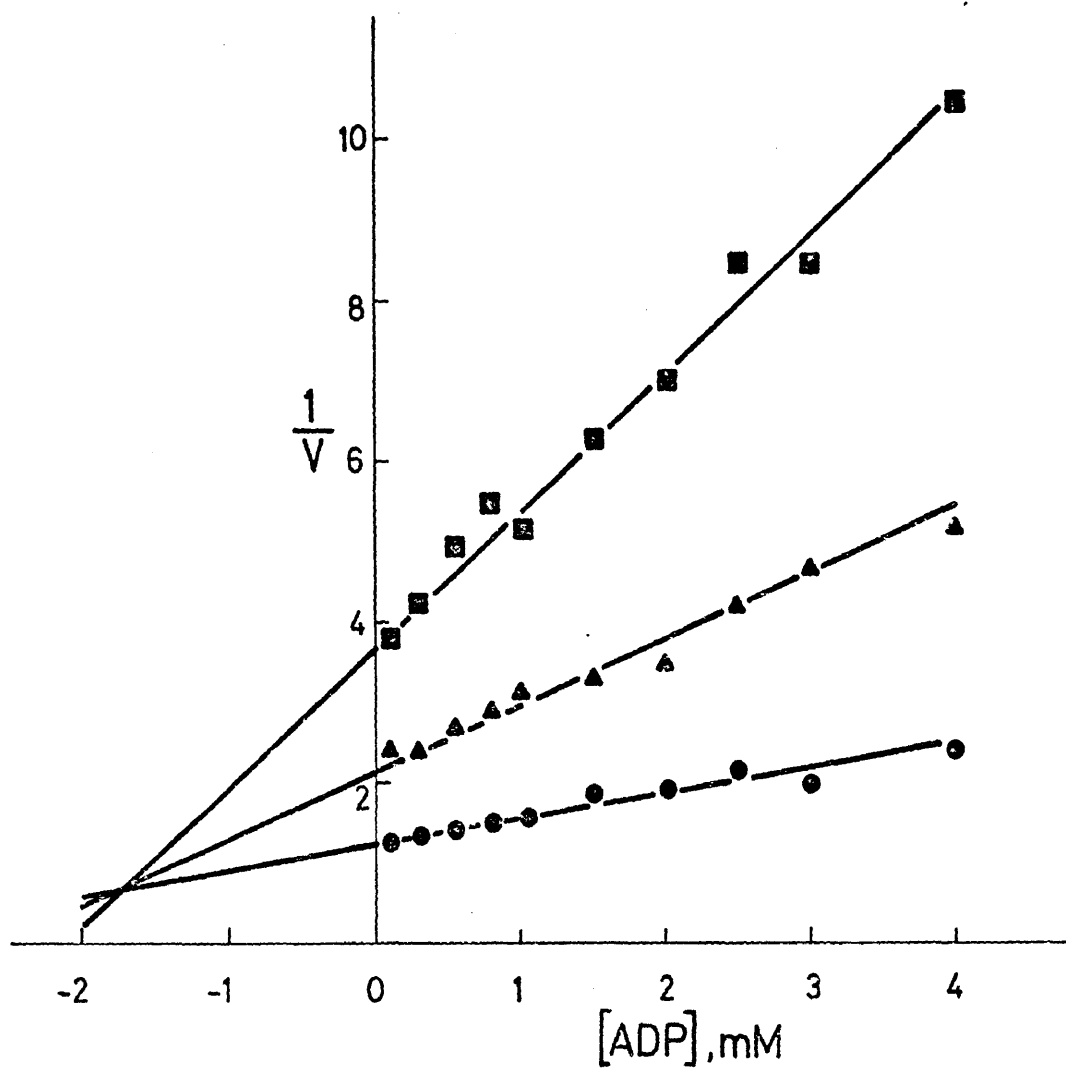


Fig. 52 - Inhibición de ATPasa unida a la membrana por ADP en presencia de tripsina. Representación de Dixon en idénticas condiciones a la anterior. Concentración de ATP, ●-● 8 mM; ▲-▲ 4,8 mM; ■-■ 1,6 mM.

centraciones fijas de inhibidor que se cruzan sobre el eje de ordenadas, y los inversos de velocidades iniciales frente a saturación de inhibidor originan rectas, para concentraciones constantes de sustrato, que se cortan en un punto del segundo cuadrante. Estas dos condiciones dan casi seguridad absoluta de que el inhibidor es competitivo. Si además las gráficas de la representación de Dixon mantienen su linealidad a altas concentraciones de inhibidor, éste es competitivo puro; si se convierte en hipérbolas el inhibidor es parcialmente competitivo.

Las Figs. 51 y 52 muestran la representación de Dixon para ATPasa unida a membranas en ausencia y presencia de tripsina respectivamente. Las tres rectas obtenidas a tres concentraciones distintas de ATP se cortan en un punto del segundo cuadrante, lo que confirma que el inhibidor es competitivo y competitivo puro, ya que las rectas se mantienen como tales a altas concentraciones de ADP. La K_i calculada gráficamente nos da un valor de 1.75 mM independientemente de la acción de la proteasa, lo que concuerda con los resultados deducidos de las representaciones de Lineweaver y Burk.

Las Figs. 53 y 54 presentan experiencias paralelas hechas con la ATPasa en estado soluble. Una vez más las gráficas se curvan hacia arriba ofreciendo dificultades a la determinación de parámetros. La prolongación de la aparente parte lineal de estas curvas nos permite encontrar un punto de confluencia en el segundo cuadrante, con una K_i 0,75 mM. En consecuencia esta representación corrobora la afirmación de que el ADP es un inhibidor competitivo puro de la ATPasa también al estado soluble.

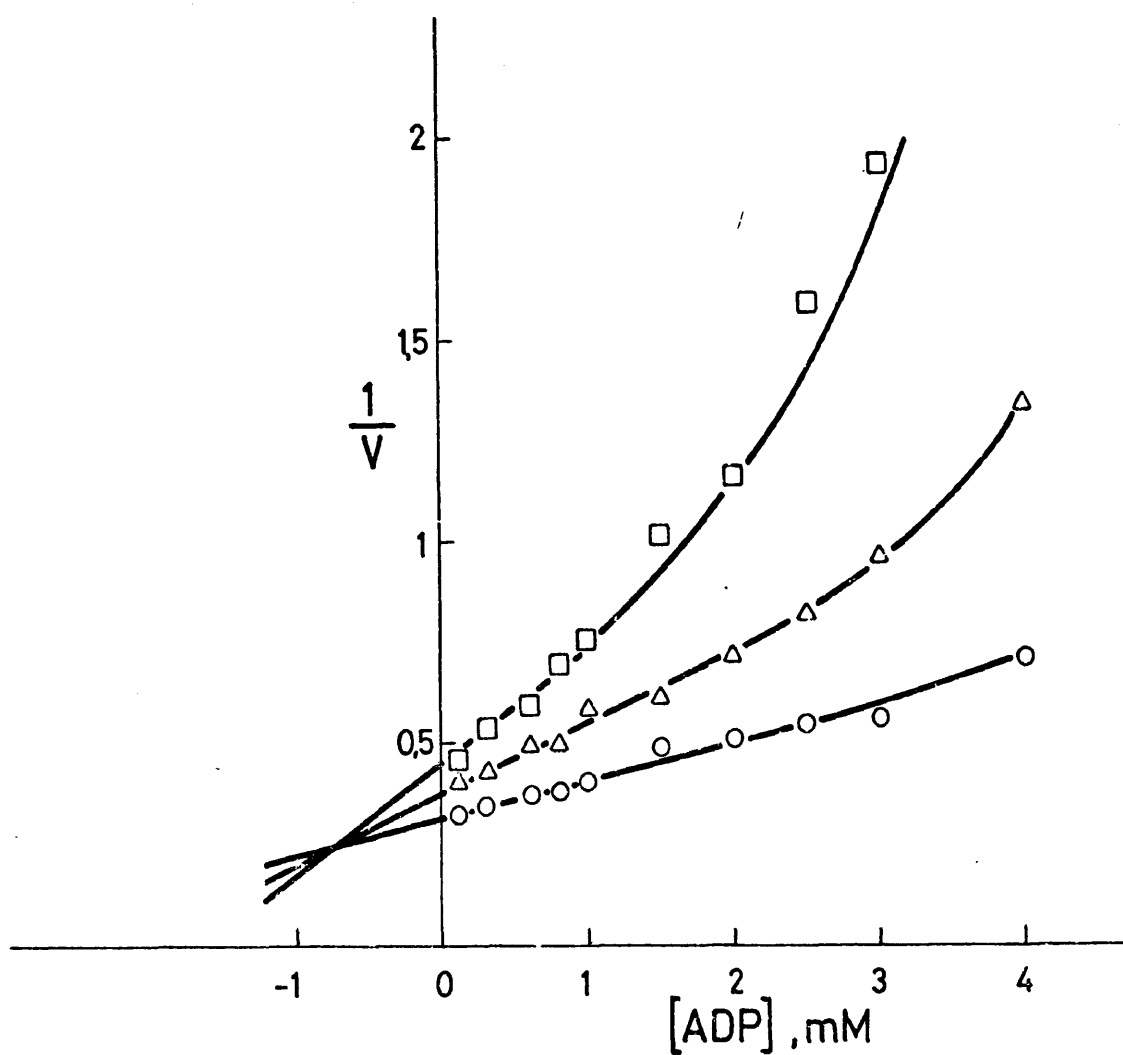


Fig. 53 - Representación de Dixon para ATPasa soluble inhibida por ADP, en condiciones normales de ensayo y sin tripsina. El ATP se mantuvo en concentraciones fijas para cada gráfica. $\circ - \circ$ ATP 8 mM; $\Delta - \Delta$ ATP 4,8 mM; $\square - \square$ ATP 1,6 mM.

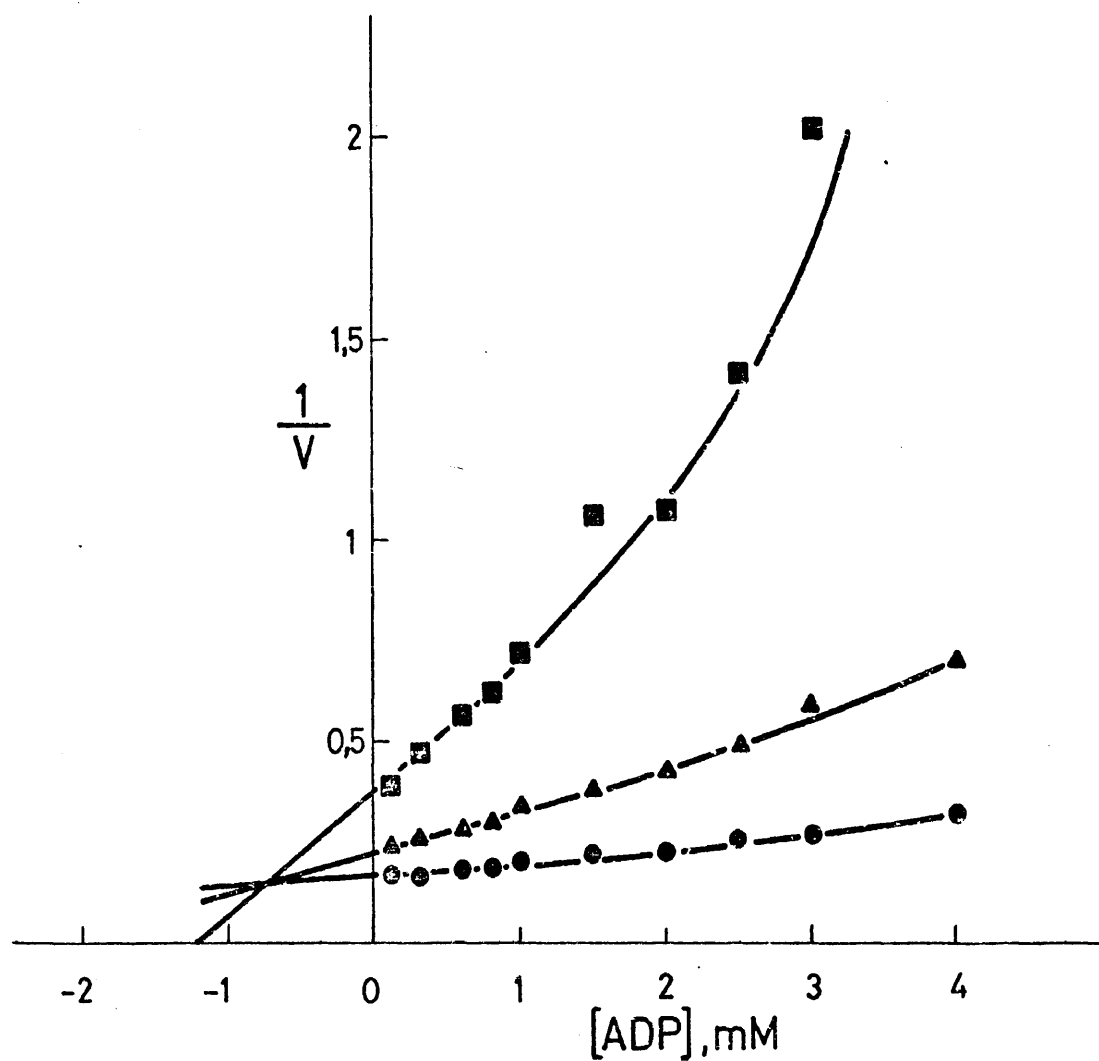


Fig. 54 - Representación de Dixon para ATPasa soluble inhibida por el ADP, medida en presencia de tripsina. Las condiciones de ensayo son igual a las anteriores. Concentración de ATP, ●-● 8 mM; ▲-▲ 4,8 mM; ■-■ 1,6 mM.

Queremos resaltar la diferencia de afinidad por el ADP entre la enzima soluble y la unida a la membrana. Al igual que sucedía con el sustrato la afinidad de la enzima soluble por el ADP es mayor que la de la asociada a la membrana. Esta diversidad de actuación puede ser un exponente más de regulaciones o modulaciones de la actividad de la ATPasa cuando se encuentra sumergida en el microentorno de la membrana bacteriana.

Otro punto a destacar es la aparente diferencia de afinidad entre el ADP y el ATP. Tanto al estado soluble como unida a la membrana la ATPasa tiene una afinidad mayor por el inhibidor que por el ATP. Si esta diferencia es significativa podría alcanzar su verdadero sentido teniendo en cuenta que en aerobiosis el microorganismo sintetiza ATP teniendo al ADP como sustrato inmediato de la reacción.

Terminamos de demostrar que el ADP es un inhibidor competitivo de la ATPasa de E. coli, con una K_i 1,7 mM para la enzima unida a la membrana y 0,75 mM para la ATPasa en estado soluble. Esto nos permite concluir que el ADP afecta a la afinidad de la enzima por el sustrato, pero no cambia la V_m de la reacción.

La Fig. 56 nos muestra el orden aparente de reacción de la ATPasa ligada a la membrana para el ADP, a dos concentraciones distintas de sustrato. Los coeficientes de interacción (190) que expresan el orden aparente de reacción para el inhibidor, son notablemente bajos. Su dependencia de la concentración de sustrato no es manifiesta;

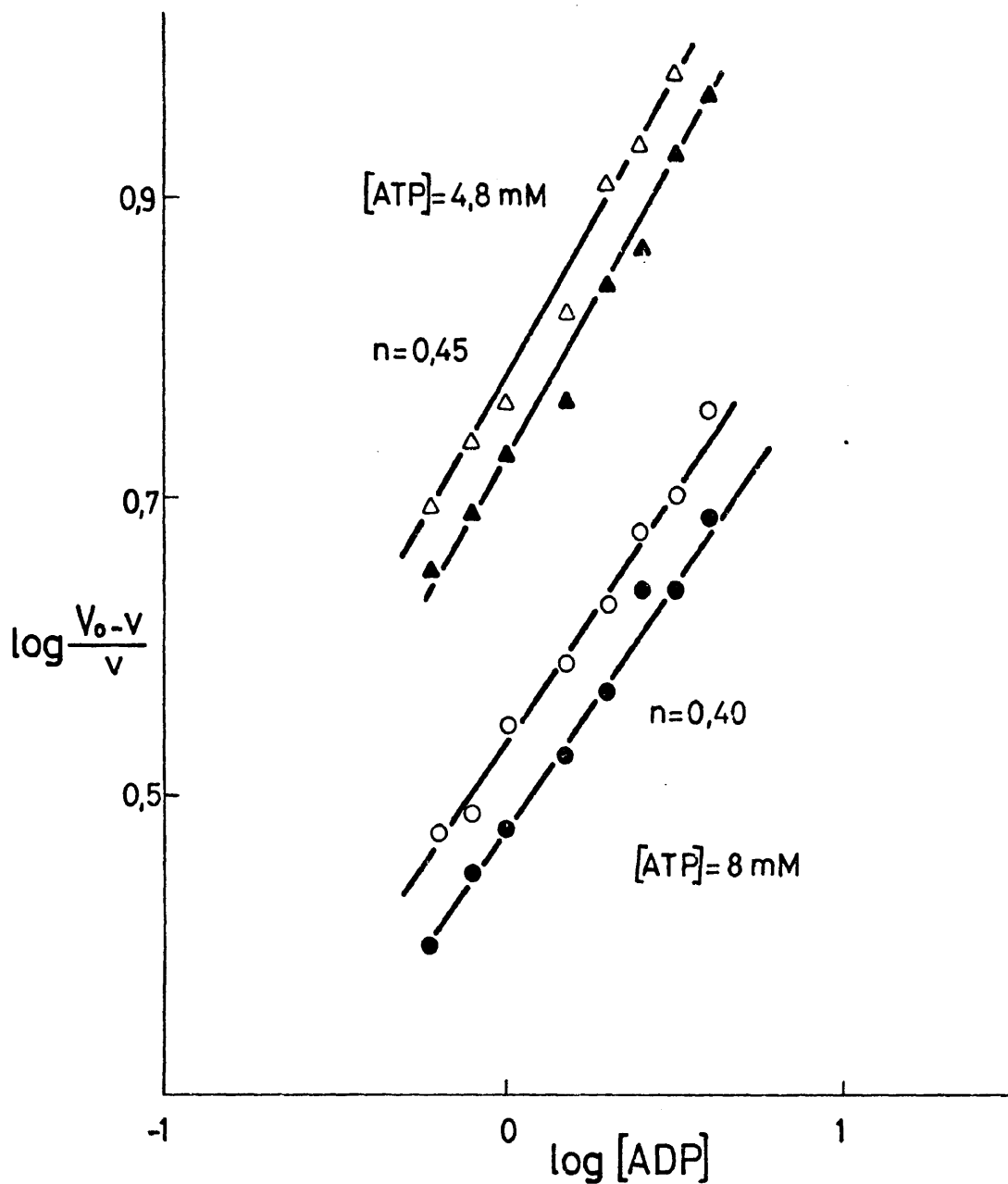


Fig. 56 - Orden de reacción de la ATPasa de *E. coli* unida a la membrana para el ADP. Se representa una función de la fracción de sitios ocupados, a dos concentraciones fijas de sustrato, frente a concentraciones de ADP. El ensayo fué hecho en condiciones normales. Las concentraciones de ATP fueron las siguientes: 8 mM, (●-● con tripsina, ○-○ sin tripsina); 4,8 mM (▲-▲ con tripsina y △-△ sin tripsina).

si bien parece ser constante la tendencia a disminuir el orden aparente de la reacción con el incremento de la concentración de sustrato. Se encontraron órdenes de reacción de 0,40, 0,44 y 0,51 para concentraciones de sustrato de 8 mM, 4,8 mM y 1,6 mM. Este último no figura en la gráfica por razones de claridad. Las diferencias son pequeñas pero creemos que son significativas.

La Fig. 57 presenta experiencias paralelas a las de la Fig. anterior, realizadas con ATPasa soluble. Los órdenes aparentes de reacción con respecto al inhibidor son bastante más altos que los anteriores aunque mantienen la misma tendencia. Para concentraciones de sustrato 8 mM, 4,8 mM y 1,6 mM los coeficientes de interacción calculados fueron de 0,75, 0,85 y 1,2. El último no aparece en la gráfica. Al igual que con la ATPasa unida a la membrana los coeficientes de interacción parecen ser tanto menores cuanto mayor es la concentración de sustrato. Los datos de las dos figuras precedentes fueron obtenidos en ausencia y presencia de tripsina, sin que se advierta ninguna diferencia de comportamiento entre ambos casos.

La velocidad máxima de una reacción no está alterada por el efecto de un inhibidor de naturaleza competitiva. Esto quiere decir que a concentraciones suficientemente grandes de sustrato, en que se alcance teóricamente la velocidad máxima, el orden de la reacción para el inhibidor competitivo debe ser cero.

Los órdenes aparentes de reacción encontrados para el ADP, en presencia de concentraciones fijas de sustrato, que acabamos

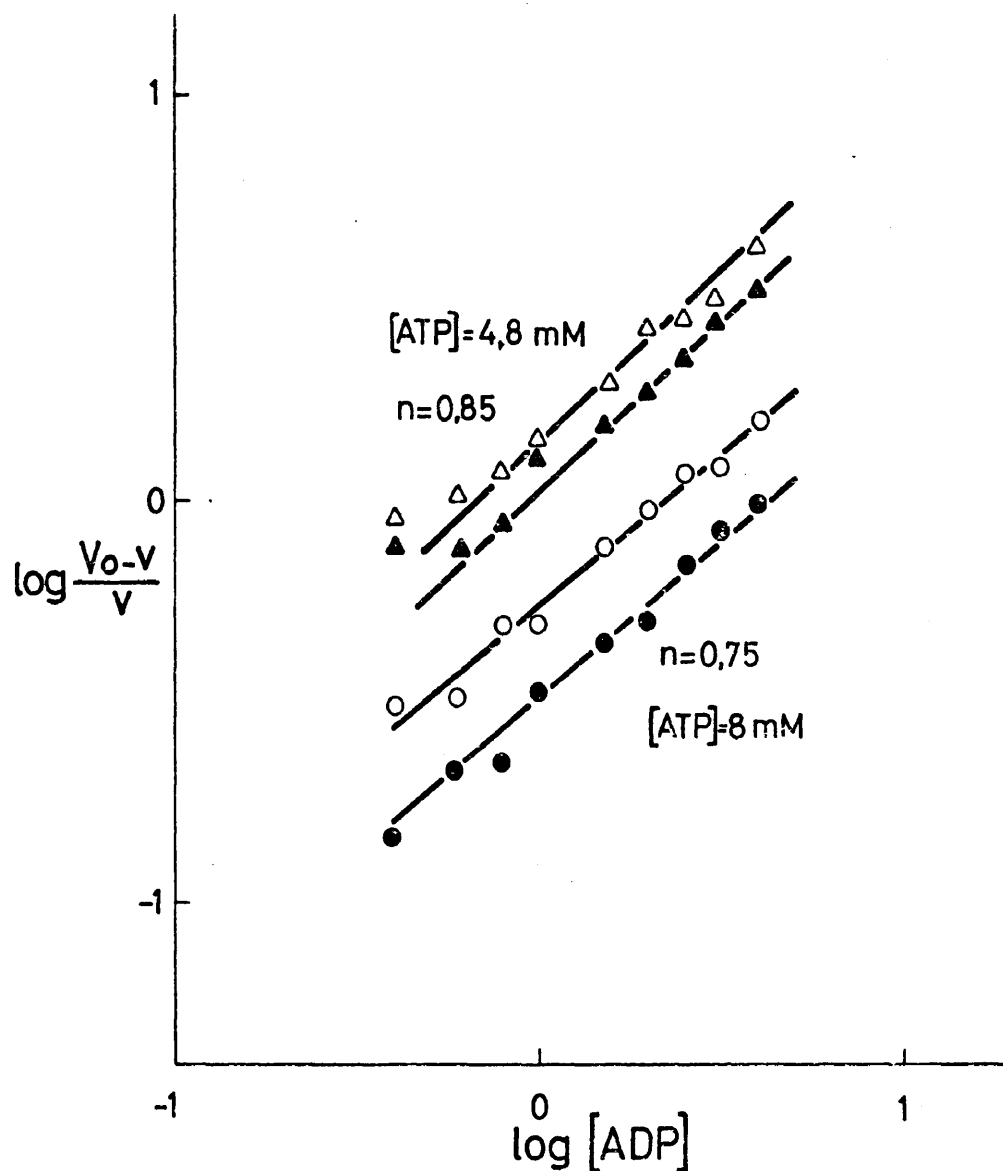


Fig. 57. Orden de reacción de la ATPasa soluble para el ADP.

Representación de Hill para el inhibidor a concentraciones fijas de sustrato efectuada en las mismas condiciones que la anterior. Las concentraciones de ATP son: 8 mM (●-● con tripsina, ○-○ sin ella); 4,8 mM (▲-▲ con tripsina, Δ-Δ sin ella).

de presentar, corroboran esta afirmación. En efecto, tanto para la ATPasa soluble como para la enzima asociada a la membrana, los órdenes aparentes de reacción con respecto al inhibidor se hacen más pequeños a la par que se van incrementando las concentraciones de sustrato, de donde parece lógico inducir que ulteriores cantidades de sustrato reducirían más y más el orden aparente de reacción para el ADP, hasta alcanzar un límite de orden cero, que coincidiría con la V_m de la reacción para el sustrato.

El orden aparente de reacción de la ATPasa asociado a la membrana con respecto al sustrato, para concentraciones fijas de inhibidor es presentado en la Fig. 58. Cuando más elevada es la concentración de ADP, más pequeño es el orden de reacción para el sustrato, alcanzándose el orden máximo de reacción en ausencia de inhibidor.

Sabemos que la ATPasa unida a la membrana no presenta cooperatividad, al menos positiva, para el sustrato; lo que quiere decir que sus sitios activos son independientes, que no existe interacción entre ellos. En consecuencia, el descenso en el orden aparente de reacción no cabe atribuirlo a debilitamiento de interacciones entre los distintos sitios activos. Ahora bien, también hemos demostrado que el ADP es un inhibidor competitivo cuyo sitio de fijación debe ser el centro activo. Un incremento en la concentración de ADP, debe ir acompañado de un descenso de moléculas de sustrato unidas a dicho centro, lo que lógicamente se traduce en un menor orden aparente de reacción para el sustrato.

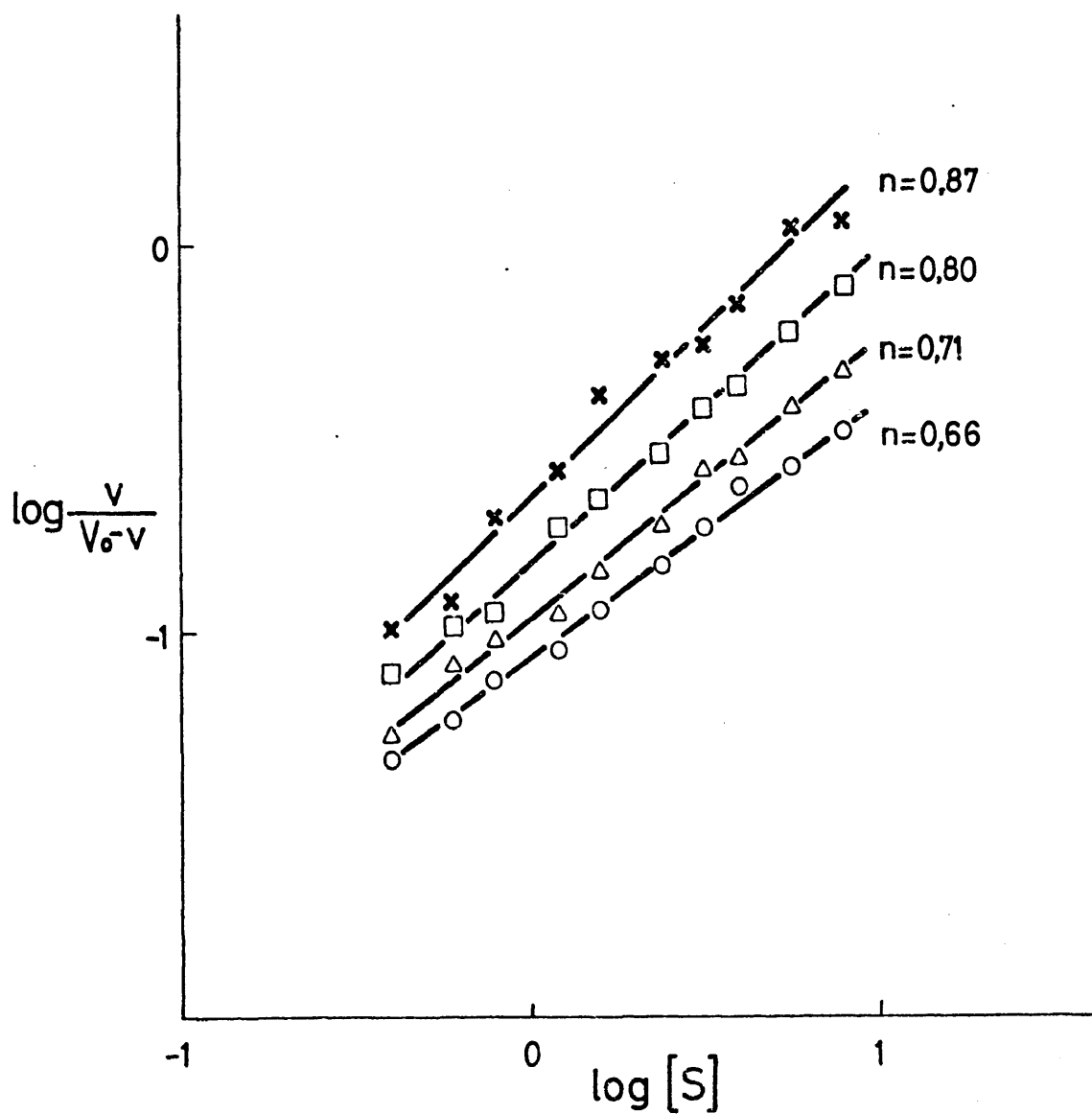


Fig. 58 - Orden aparente de reacción de la ATPasa unida a la membrana con respecto al sustrato, para concentraciones fijas de inhibidor. Las concentraciones de ADP fueron las siguientes: $\circ - \circ$ 2,4 mM; $\Delta - \Delta$ 1,2 mM, $\square - \square$ 0,4 mM; $\times - \times$ 0 mM. Todas las experiencias están hechas en ausencia de tripsina. Se omiten las efectuadas en presencia de tripsina por ser totalmente semejantes. Las restantes condiciones de en sayo son las normales descritas en Materiales y Métodos.

A concentraciones suficientemente elevadas de ADP, la proporción de moléculas de sustrato unidas al sitio activo puede ser tan pequeña que la reacción hidrolítica sea indetectable. Se intuye que el orden de reacción en tal caso debe ser cero.

La Fig. 59 muestra las mismas experiencias que la anterior realizadas con la ATPasa soluble. La interpretación de estos datos ofrece alguna diferencia. La parte inferior de las cuatro gráficas, con un coeficiente de interacción superior a la unidad, experimenta un descenso de dicho coeficiente, proporcional a la concentración de inhibidor presente en el medio de reacción. Este cambio en el orden aparente de reacción puede ser debido a un debilitamiento de las interacciones entre los distintos sitios, como efecto de la presencia del inhibidor, o simplemente a una aparente disminución de sitios activos para el sustrato por el hecho de estar ocupados por el inhibidor.

Hemos visto con anterioridad que la ATPasa soluble presenta un cambio de pendiente en la representación de Hill, a una concentración de sustrato próximo a la K_m . Los gráficos de la presente Fig. también tienen ese cambio de pendiente, pero las concentraciones de sustrato a que tiene lugar, van desde 2 mM para el control hasta 4 mM para la concentración más alta de inhibidor, pasando por concentraciones intermedias para ADP 0,4 y 1,2 mM. Esta variación viene impuesta por el desplazamiento de la K_m a concentración superior de sustrato, como consecuencia de la pérdida de afinidad para el mismo sustrato en

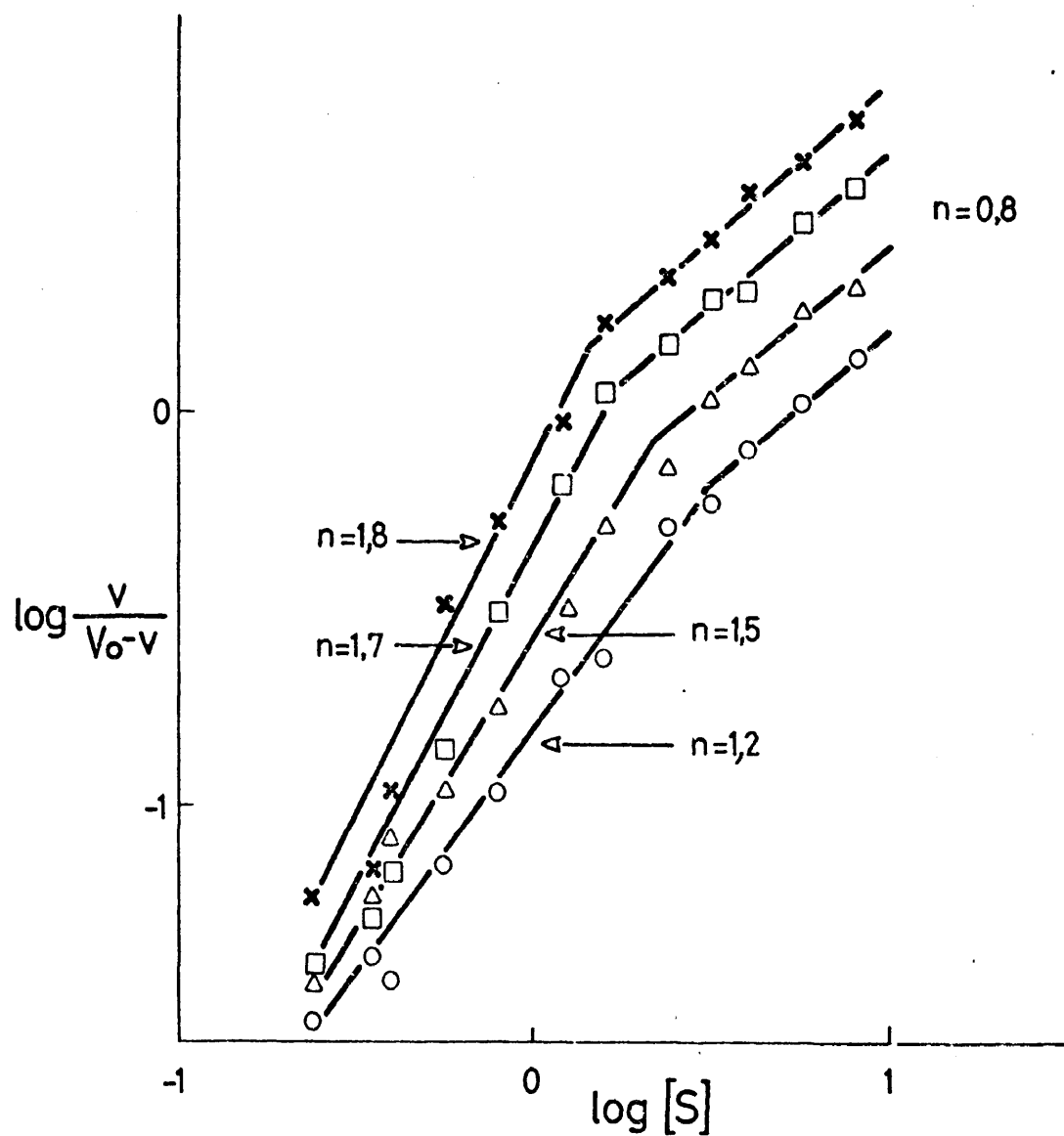


Fig. 59 - Orden aparente de reacción de la ATPasa soluble con respecto al sustrato, para concentraciones fijas de inhibidor. Las concentraciones de ADP fueron: $\circ - \circ$ 2,4 mM; $\triangle - \triangle$ 1,2 mM; $\square - \square$ 0,4 mM y $x - x$ 0 mM. Todos los datos mostrados fueron obtenidos sin tripsina en medio de reacción.

Presencia del inhibidor.

Lo notable es que en apariencia por encima del cambio de pendiente las representaciones de Hill se mantienen paralelas, no siendo afectado su orden aparente de reacción por las distintas concentraciones de inhibidor.

Si esto es cierto, parece lógico pensar que existen dos tipos diferentes de sitios activos como ya hemos apuntado anteriormente; que aquellos de mayor coeficiente de interacción tienen capacidad para fijar ADP con una constante de afinidad semejante o mayor que la del sustrato, de donde se deriva la inhibición competitiva del ADP, y que los sitios restantes no fijan ADP o le fijan con una afinidad tan baja que dentro del error experimental no se advierte cambio alguno en el orden de reacción.

Inhibición de la ATPasa soluble por dicitclohexilcarbodiimida.

Desde que Holloway y col. (191) demostraron que el dicitclohexilcarbodiimida era un potente inhibidor para la ATPasa de la membrana mitocondrial interna, en tanto que no alteraba la actividad de la forma soluble, fueron muy numerosos los trabajos que se han desarrollado alrededor de este todavía extraño inhibidor. Publicaciones posteriores han venido a demostrar que se fija a una proteína de la membrana mitocondrial de peso molecular 10.000 (193), que el DCCD inhibe la fosforilación oxidativa irreversiblemente reaccionando con un intermediario o con un componente de la membrana esencial para el funcionamiento de la membrana (192), que esa proteína es un proteolípido que acom

paña a las partículas OS-ATPasa de la mitocondria (194) y que esa proteína puede aislarse de las partículas OS-ATPasa, confirmandose su peso molecular en 10.000 (195).

En microorganismos ha sido estudiado este inhibidor también ampliamente. La ATPasa unida a la membrana de Streptococcus faecalis (196) ha manifestado un comportamiento semejante a la de mitocondria, no apareciendo afectada por el inhibidor la enzima al estado soluble.

En E. coli se ha comprobado el efecto del DCCD con ATPasa ligada a la membrana (112) y con la enzima soluble (197), encontrándose diferencia esencial con respecto a las aportaciones anteriores.

Nuestros resultados con este inhibidor se resumen en la Fig. 60. Una vez más la ATPasa al estado soluble se muestra insensible en su actividad a la acción del DCCD. Una concentración 40 mM de inhibidor no afecta en absoluto la actividad enzimática de la ATPasa soluble de E. coli. Sin embargo, la enzima ligada a la membrana presenta una extensa y rápida inhibición aun a concentraciones muy bajas de inhibidor. DCCD 0,4 mM inhibe un 55% de la actividad enzimática, pero a partir de esa concentración nuevos y mayores aumentos de cantidad de inhibidor no producen cambios de consideración a juzgar por el lento descenso en la actividad de la enzima.

Más adelante discutiremos más ampliamente el mecanismo de inhibición de la ATPasa asociada a la membrana por el DCCD. Por

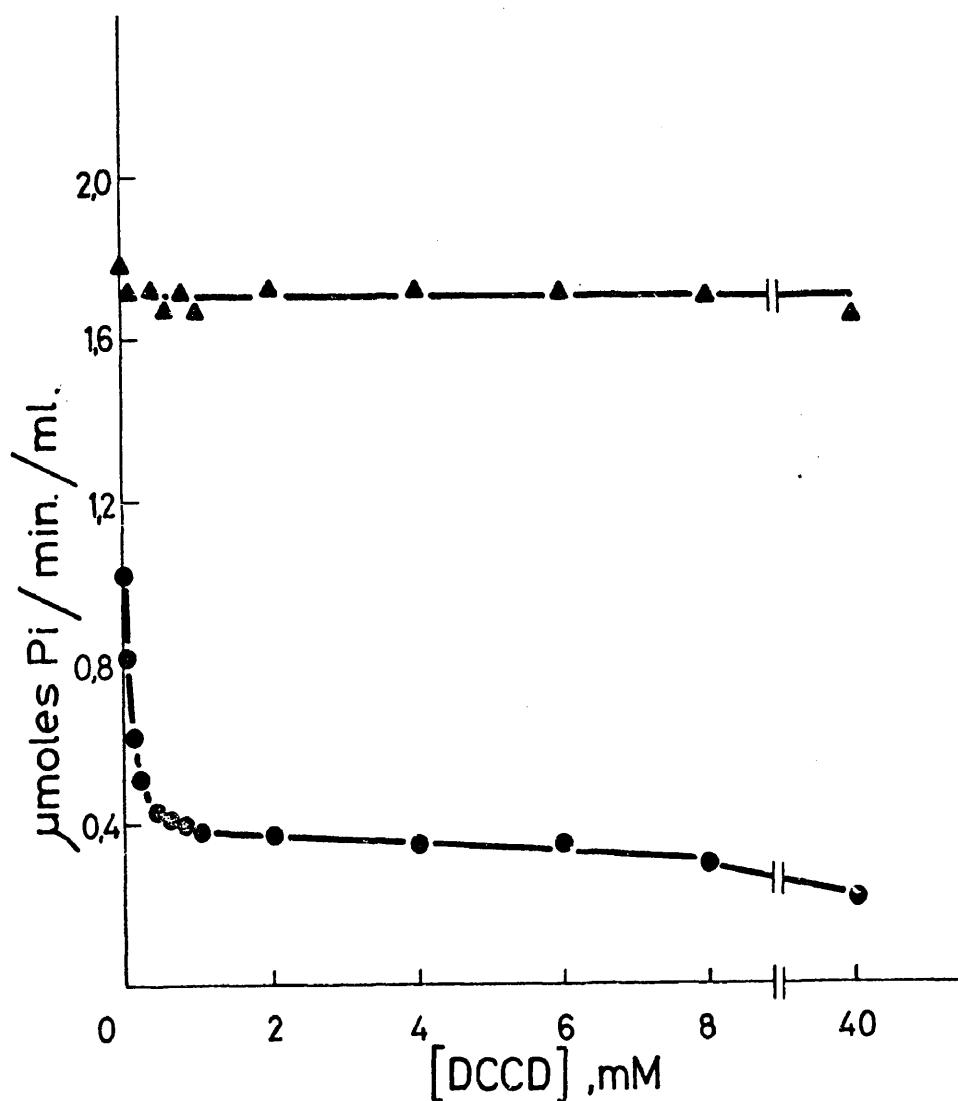


Fig. 60 - Inhibición de la ATPasa de E.coli por dicitohexilcarbodiimida.

El inhibidor fué añadido al medio de reacción disuelto en 5 μl de metanol.

El metanol en estas cantidades no tenía efecto alguno sobre la actividad

enzimática. Los datos están obtenidos en presencia de tripsina. ●-● ATP-

asa unida a la membrana; ▲-▲ ATPasa soluble. La actividad está refe-

rida a 1 ml de suspensión de membranas y a 1 ml de enzima solubaliza-

da a partir de la misma cantidad de membranas.

ahora digamos que tal como se ha probado en ATPasa mitocondrial, y se ha sugerido en ATPasa de Streptococcus faecalis el DCCD inhibe la ATPasa asociada a la membrana de E.coli reaccionando covalentemente con una proteína de la membrana bacteriana que de alguna manera está implicada en la función hidrolítica de la ATPasa, aunque específicamente su acción esté dirigida a otra función de la misma ATPasa o de alguna proteína en estrecha relación genética o funcional con ella (198).

La ATPasa soluble aislada de las proteínas implicadas en la construcción de su entorno en la membrana, no ve afectada su capacidad hidrolítica por la presencia del inhibidor en el medio de reacción.

La azida de sodio es una sustancia profusamente utilizada como inhibidor de actividades enzimáticas. Las actividades ATPásicas más estudiadas de microorganismos son inhibidas por la azida.

La ATPasa de Micrococcus lysodeikticus es inhibida un 60% a concentración de azida 0,1 mM (138) la de Bacillus megaterium (166) y Escherichia coli (111, 112, 117) son también inhibidas en distintos grados dependiendo de la concentración del inhibidor. Nuestros resultados se presentan en la Fig. 61. La inhibición producida por la azida es dependiente de la concentración de inhibidor llegando a un 70% de inactivación a concentración 0,1 mM. Pero ya a concentraciones muy bajas, del orden de 5 μ M originan una notable caída de actividad. El

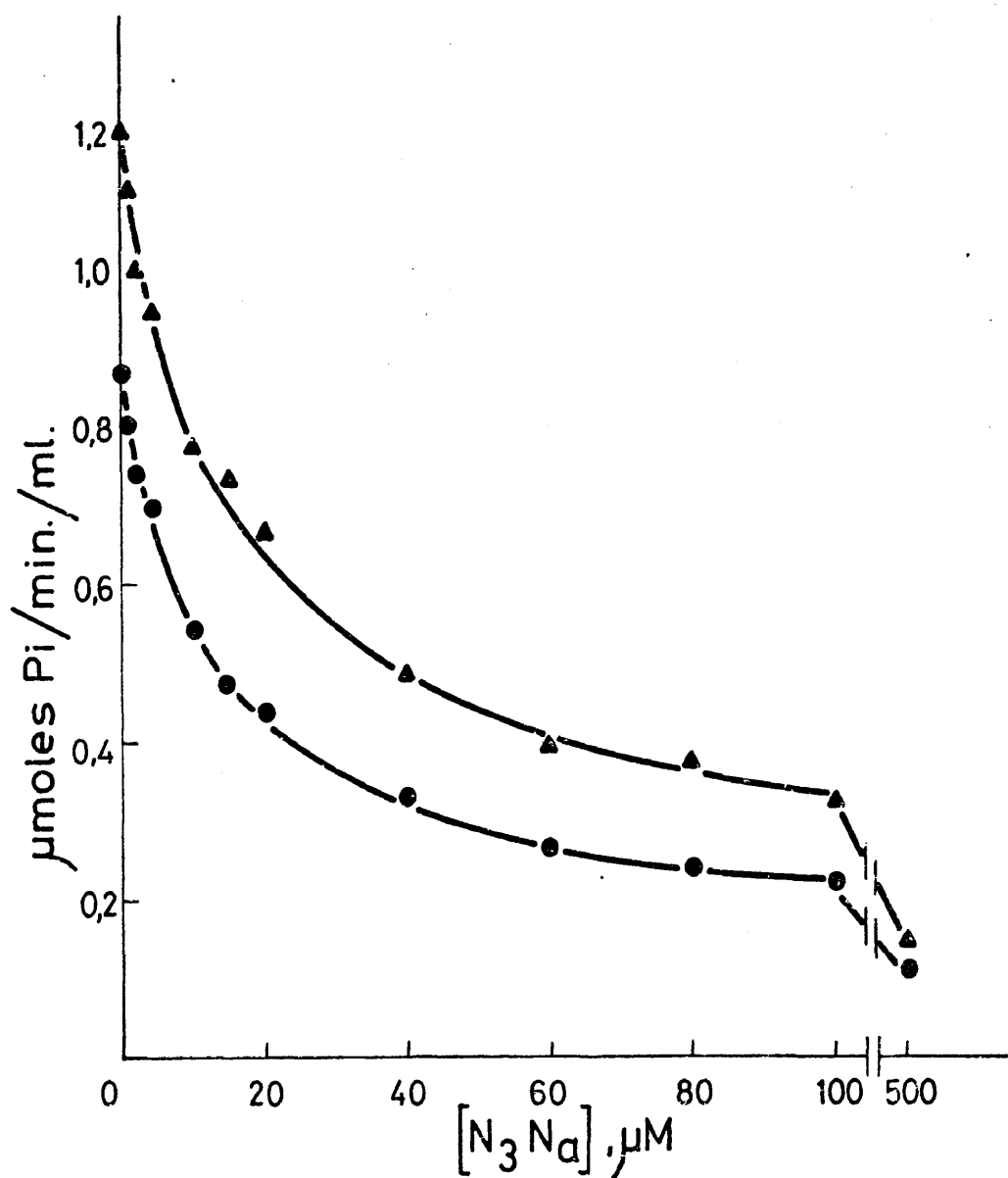


Fig. 61 - Inhibición de la ATPasa de *E. coli* por N₃Na. Todos los datos fueron obtenidos en presencia de tripsina. La actividad enzimática está referida a 1 ml de suspensión de membrana y a 1 ml de ATPasa soluble procedente de la misma cantidad de membranas. ●-● ATPasa unida a la membrana; ▲-▲ ATPasa soluble.

comportamiento de la ATPasa frente a la azida es independiente del estado en que se la ensaye ya unida a la membrana ya solubilizada.

La ouabaina es un glicósido cardiotónico y un poderoso inhibidor de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ . Su capacidad de asociación y disociación de la enzima varía con las especies en que se estudie y aun con los tejidos (199, 200) y su mecanismo de inhibición parece estar relacionado con una reducción de la diferencia de energía conformacional entre la forma fosforilada y la no fosforilada de la enzima (201).

Cuando hemos estudiado esta sustancia como posible inhibidor de la ATPasa de E.coli, los resultados fueron totalmente negativos. Ni la enzima unida a la membrana ni la soluble alteran en absoluto su actividad por la presencia del glicósido. Muestras incubadas durante 30 min a 37°C con la ouabaina y posteriormente ensayadas en condiciones normales, tampoco mostraron pérdida alguna de actividad.

Nuestros resultados demuestran que la ATPasa de E.coli no es inhibida por la ouabaina; estableciendo una diferencia más entre funciones de ATPasa de distintos orígenes. Diferencia que es comprensible si tenemos en cuenta que la ATPasa activada por Na^+ y K^+ necesita tener K^+ en el sitio del K^+ para que la enzima libere el fosfato que ya ha sido hidrolizado del ATP (202) y que la ouabaina se fija a la ATPasa en el sitio del K^+ compitiendo parcialmente con el catión (203). Por consiguiente los distintos mecanismos de reacción, impuestos por

las diferentes funciones de la ATPasa activada por Na^+ y K^+ de las ATPasas bacterianas, son las responsables de la capacidad inhibidora de una sustancia como la ouabaina o de su falta de poder inhibidor.

La oligomicina y compuestos relacionados como la rutamicina son inhibidores tradicionales de la ATPasa mitocondrial, aunque su capacidad inhibidora no es total; depende de la presencia de una proteína de peso molecular 18.000 (204, 205). Esta proteína acompaña a la ATPasa en la membrana y en algunas fracciones particuladas solubles confiriéndole en tal caso sensibilidad a la oligomicina, pero puede separarse de la enzima con lo que la ATPasa pierde esa sensibilidad.

Ensayos efectuados con la ATPasa de E.coli no dieron ningún resultado positivo. La enzima soluble y la asociada a la membrana no mostraron ninguna diferencia de comportamiento con respecto a la oligomicina, siendo ambas completamente insensibles a su acción. Desconocemos la razón que marca esta diferencia entre la ATPasa mitocondrial y las ATPasas bacterianas.

Efecto de la temperatura en la ATPasa

El estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de una enzima puede abordarse desde dos puntos de vista diferentes. Los cambios de velocidad pueden ser debidos a alteraciones en la estabilidad de la proteína o bien a efectos producidos sobre la misma reacción enzimática.

Las alteraciones en la estabilidad están íntimamente ligadas a la desnaturalización proteica por el calor, mientras que las variaciones de la velocidad de reacción pueden tener múltiples causas: cambios en la velocidad de rotura del complejo, en la afinidad enzima-sustrato, en las funciones de pH.

La Fig. 62 presenta la estabilidad de la ATPasa frente al incremento de temperatura. Todas las muestras se mantuvieron durante una hora a las temperaturas indicadas, se llevaron a temperatura ambiente y se ensayaron. Lo mismo la ATPasa asociada a la membrana que la soluble muestran una pequeña elevación en su actividad como efecto de las temperaturas de incubación. Es posible que este ambiente sea debido a una acción de la temperatura sobre la misma enzima, concretada en pequeños cambios de conformación o de ionización que son irreversibles al cambiar la temperatura, o bien en cambios mayores que son reversibles pero no totalmente. Otra posibilidad encontraría su apoyo en la acción de la temperatura sobre las proteínas relacionadas de alguna manera con la ATPasa o incluso sobre otros componentes no proteicos que acompañan a la enzima en la membrana y en el estado soluble. Una tercera posibilidad que pretenda una explicación basada en la suma de los efectos parciales de las dos anteriores, sería perfectamente aceptable ya que el efecto de la temperatura no debe estar restringido a ningún tipo concreto de componentes biológicos.

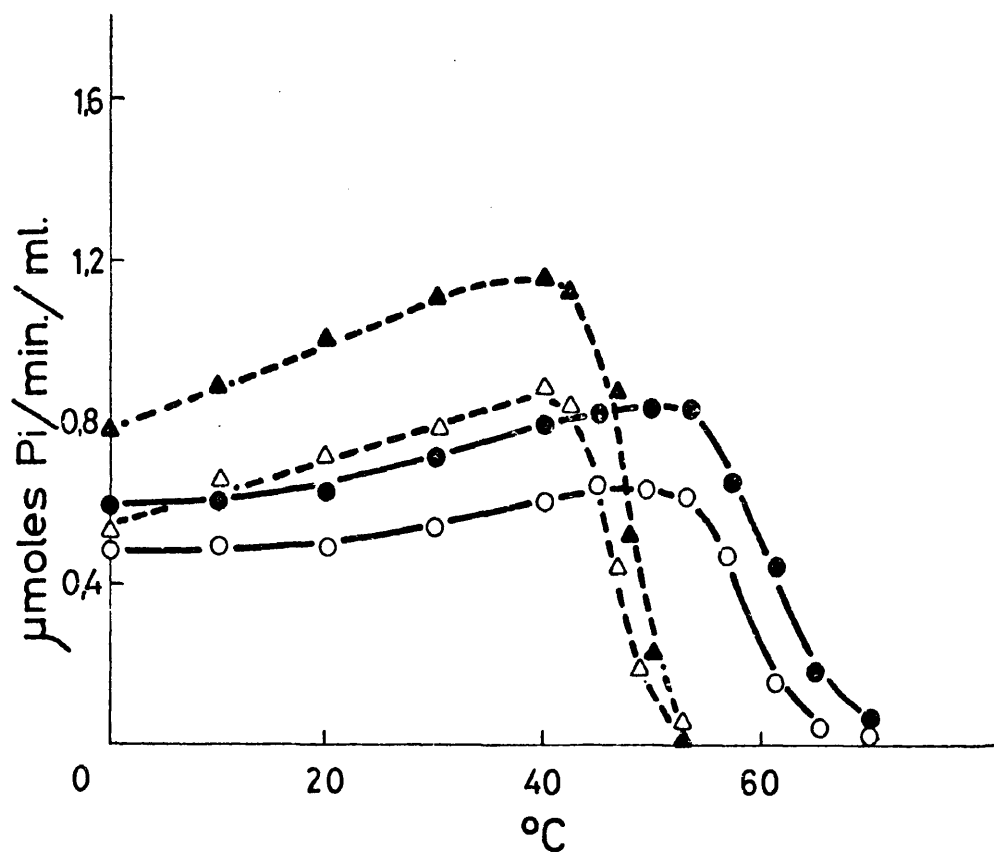


Fig. 62 - Estabilidad de la ATPasa de E. coli en función de la temperatura. Muestras de suspensión de membranas y fracción soluble se pusieron durante una hora a las temperaturas indicadas. A continuación se llevaron a 0 °C y 22 °C respectivamente, y se ensayó la actividad con alícuotas de estas muestras según las condiciones normales de ensayo. La actividad está dada por ml de suspensión de membranas o por ml de ATPasa soluble correspondiente a 1 ml de suspensión de membranas. La ATPasa unida a membrana fué determinada. ○-○ sin tripsina, ●-● con tripsina. La soluble fué ensayada Δ-Δ en ausencia de tripsina, ▲-▲ en presencia de tripsina.

Por encima de 40 °C existe una diferencia radical entre la ATPasa soluble y la asociada a la membrana. Aquella pierde bruscamente su actividad alcanzando una actividad nula alrededor de los 50 °C, mientras que la unida a la membrana conserva su capacidad de hidrólisis total o incrementada hasta los 53 °C. El comportamiento de ambas formas de ATPasa a altas temperaturas es el normal de todas las enzimas. A partir de una determinada temperatura que con pocas excepciones (206) es inferior a 70 °C, todas las enzimas se inactivan rápidamente por desnaturalización de la proteína. Ahora bien en nuestro caso hay una diferencia entre el estado soluble y el asociado a la membrana, para la misma enzima. Diferencia que puede ser debida a dos razones. La enzima soluble está privada de su medio natural y una de las consecuencias que lo acusan es su mayor sensibilidad a la acción de la temperatura.

Otra explicación atribuye la caída de actividad de la enzima soluble a un efecto de proteólisis, efecto que podría ser más intenso en la ATPasa soluble a causa de la solubilización de la proteasa o que en igualdad de condiciones se manifestaría más eficaz debido a que la membrana total tiene una concentración de proteína muy superior a la fracción soluble. Sin embargo creemos que si existiera proteólisis en la membrana, la actividad enzimática de la ATPasa comenzaría a acusarlo al mismo tiempo que la soluble aunque más lentamente.

La actividad ATPásica de la enzima asociada a la membrana y de la soluble, para distintas temperaturas, se muestra en las Figs. 63 y 64 respectivamente. Las curvas indican la relación existente entre

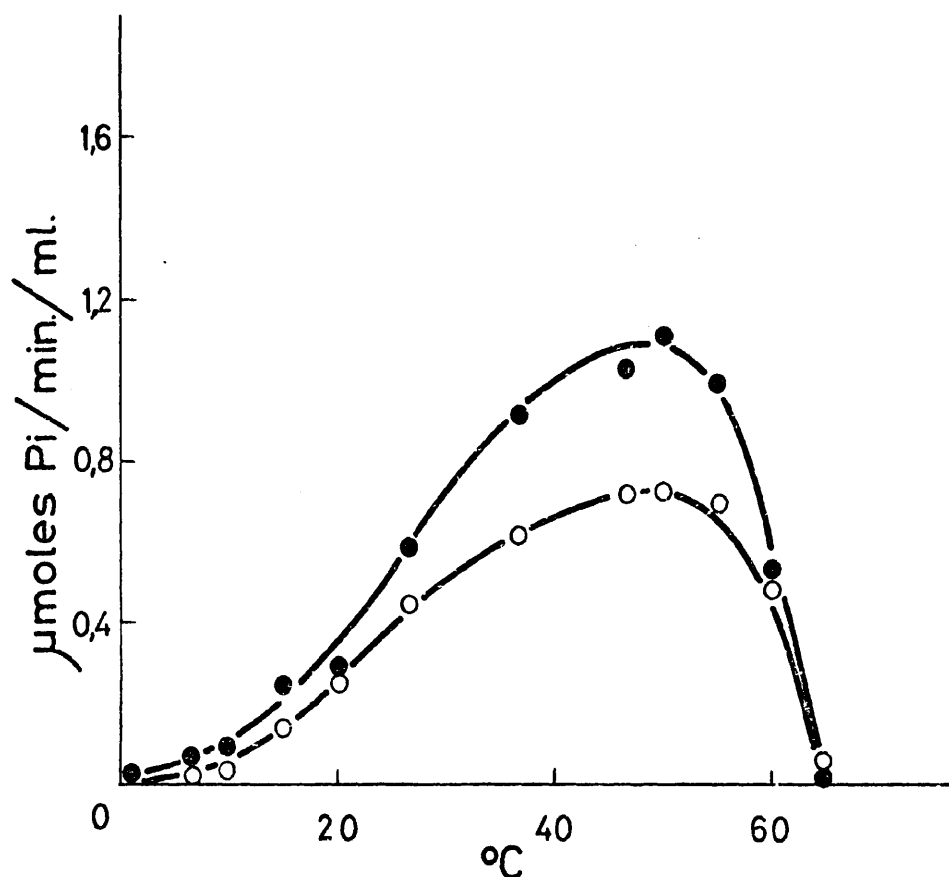


Fig. 63 - Actividad enzimática de la ATPasa como efecto de la temperatura de ensayo. Las muestras fueron preparadas a 0 °C con todos los componentes de la reacción e inmediatamente incubadas a las temperaturas expresadas en la gráfica. Las actividades están dadas como en la Fig. anterior. La ATPasa unida a la membrana fué determinada, ○-○ en ausencia de tripsina, ●-● en presensica de tripsina.

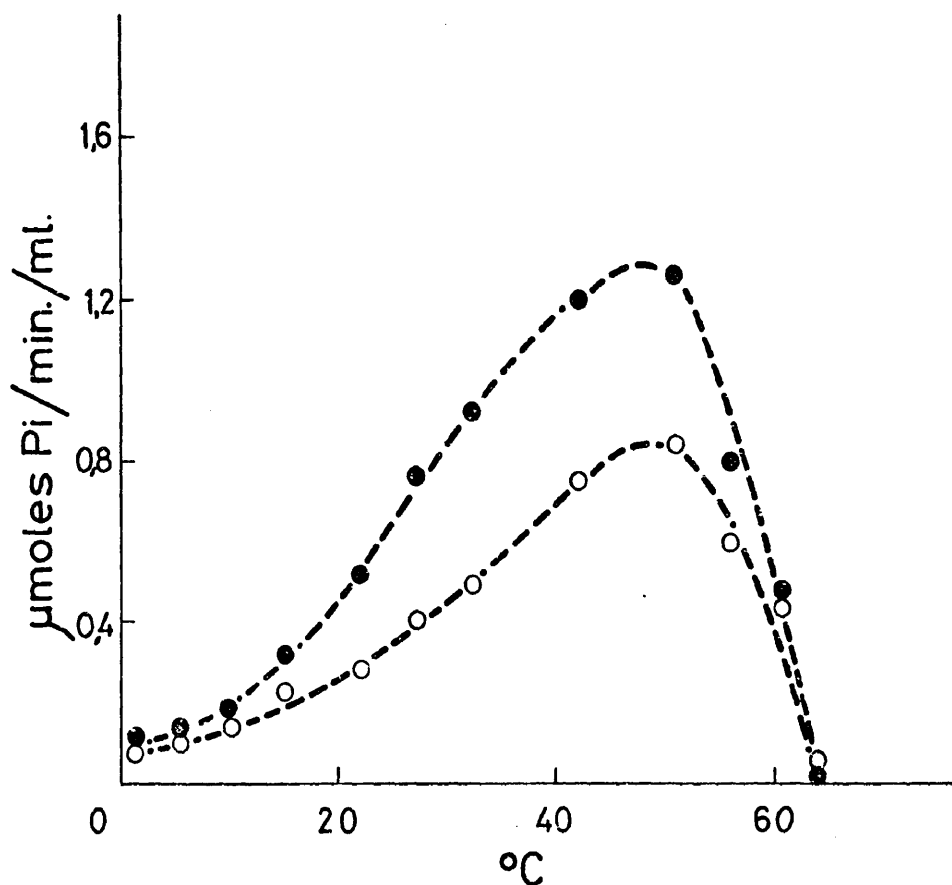


Fig. 64 - Efecto de la temperatura en la actividad de la ATPasa soluble de E. coli . Las condiciones de ensayo fueron idénticas a las de la Fig. 40. La actividad está expresada por ml de fracción soluble correspondiente a 1 ml de suspensión de membranas. El ensayo fué hecho sin tripsina ○-○ , y con ella ●-● .

la actividad enzimática y la temperatura del medio de reacción. Esta relación puede expresarse numéricamente mediante dos parámetros, el coeficiente de temperatura (Q_{10}) y la energía de activación (E). El coeficiente de temperatura (Q_{10}) se define como el factor en que se incrementa la velocidad cuando se elevan 10 $^{\circ}\text{C}$ la temperatura de reacción. Para las reacciones enzimáticas su valor está comprendido entre 1 y 2, en todo caso inferior al de las reacciones no catalizadas o catalizadas con catalizadores no enzimáticos (173).

La energía de activación (E) es una constante empírica deducida de la ecuación de Arrhenius, que representa la energía que las moléculas reaccionantes tienen que adquirir para reaccionar en las condiciones a que estén sometidas. Esta constante de Arrhenius no expresa la verdadera entalpía de activación (207) obtenida de acuerdo a la teoría de las velocidades absolutas de reacción (208) pero representa una buena aproximación de aquél parámetro termodinámico, con un exceso valorado por término medio en 600 cal.

Los datos de las gráficas que terminamos de presentar muestran el resultado de, al menos, dos efectos distintos de la temperatura. Inicialmente la velocidad de reacción se incrementa a la par que crecen las temperaturas del medio de reacción. Este efecto es ejercido directamente sobre las velocidades de reacción enzimática, sin que sepamos con exactitud qué paso del mecanismo de hidrólisis del ATP está más afectado por el aumento de temperatura. Más tarde, a partir de 45 $^{\circ}\text{C}$, al incremento de velocidad hidrolítica se superpone la inactiva-

ción de la enzima por el calor, inactivación que viene impuesta por una destrucción o desnaturalización probablemente irreversible de la proteína. En todo caso tiempos de incubación de un hora determinan una pérdida irreversible de actividad.

Es de notar que no existen diferencias sustanciales de comportamiento entre la enzima soluble y la asociada a la membrana en cuanto a la acción inactivadora del calor, como ocurrió al tratar de la estabilidad.

Esta diferencia puede ser debida a los largos tiempos de incubación empleados en el estudio de la estabilidad, en comparación con los cortos (5 min.) del medio de reacción. Un periodo corto de incubación puede no ser suficiente para una desnaturalización de la proteína a una determinada temperatura o para una destrucción proteolítica. También es posible que la presencia del sustrato confiera a la enzima soluble una menor sensibilidad al calor, necesitándose temperaturas más elevadas para la inactivación. Bond (157) ha encontrado que la ATPasa de eritrocitos humanos, experimenta cambios conformacionales en presencia de Mg^{2+} y de Ca^{2+} , y estos cambios se traducen entre otros efectos, en un incremento de la susceptibilidad de la enzima a la inactivación térmica. Nuestros resultados no pueden confirmar esta afirmación.

Muestras de ATPasa soluble y unida a la membrana, incubadas durante una hora en presencia de Mg^{2+} a la concentración del medio de ensayo y en ausencia del catión, no mostraron diferencia

alguna, salvo la ya apuntada de una más rápida inactivación de la fracción soluble.

La inactivación de la enzima por el calor es en todos los casos muy rápida, lo que implica un alto coeficiente de temperatura de inactivación totalmente comparable al coeficiente de desnaturalización térmica de las proteínas. La irreversibilidad de esta inactivación nos ha imposibilitado el cálculo de las constantes termodinámicas para la desnaturalización de la ATPasa de E.coli.

Sweetman y col (209) estudiando reacciones con acoplamiento de energía, encontraron una representación de Arrhenius para la ATPasa de E.coli unida a pequeñas partículas de membrana, con una doble pendiente cuyo punto de discontinuidad se encontraba en 18,8 °C. La energía de activación por debajo de ese punto era de 33,3 Kcal/mol y por encima de 9,7 Kcal/mol. Los resultados obtenidos por Davies y col. (118) con la misma enzima de E.coli solubilizada, son bastante distintos. Dentro del intervalo de temperatura estudiado existe solo una pendiente con una energía de activación de 20,7 Kcal/mol.

Esta diferencia de comportamientos nos movió a intentar una correlación entre ambos datos. Nuestros resultados se presentan en las Figs. 65 y 66. La Fig. 65 muestra la representación del log. de la velocidad inicial de reacción frente al inverso de las temperaturas absolutas de reacción para la ATPasa de E.coli asociada a la mem-

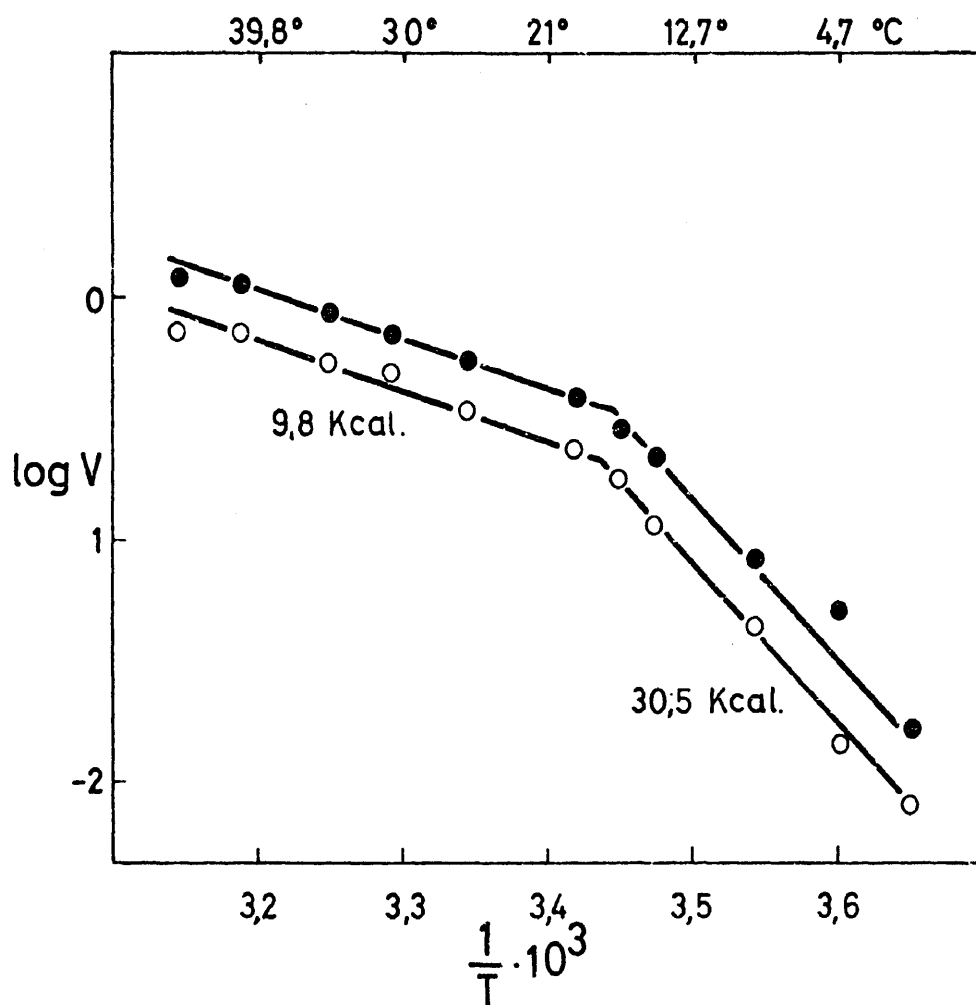


Fig. 65 - Representación de Arrhenius para la ATPasa unida a la membrana de E. coli. En ordenadas se ha puesto el log de la velocidad de hidrolisis del ATP y en abscisas los inversos de las temperaturas absolutas de incubación. Las gráficas muestran un cambio de pendiente alrededor de 18 °C, tanto en ausencia $\circ - \circ$, como en presencia de tripsina $\bullet - \bullet$.

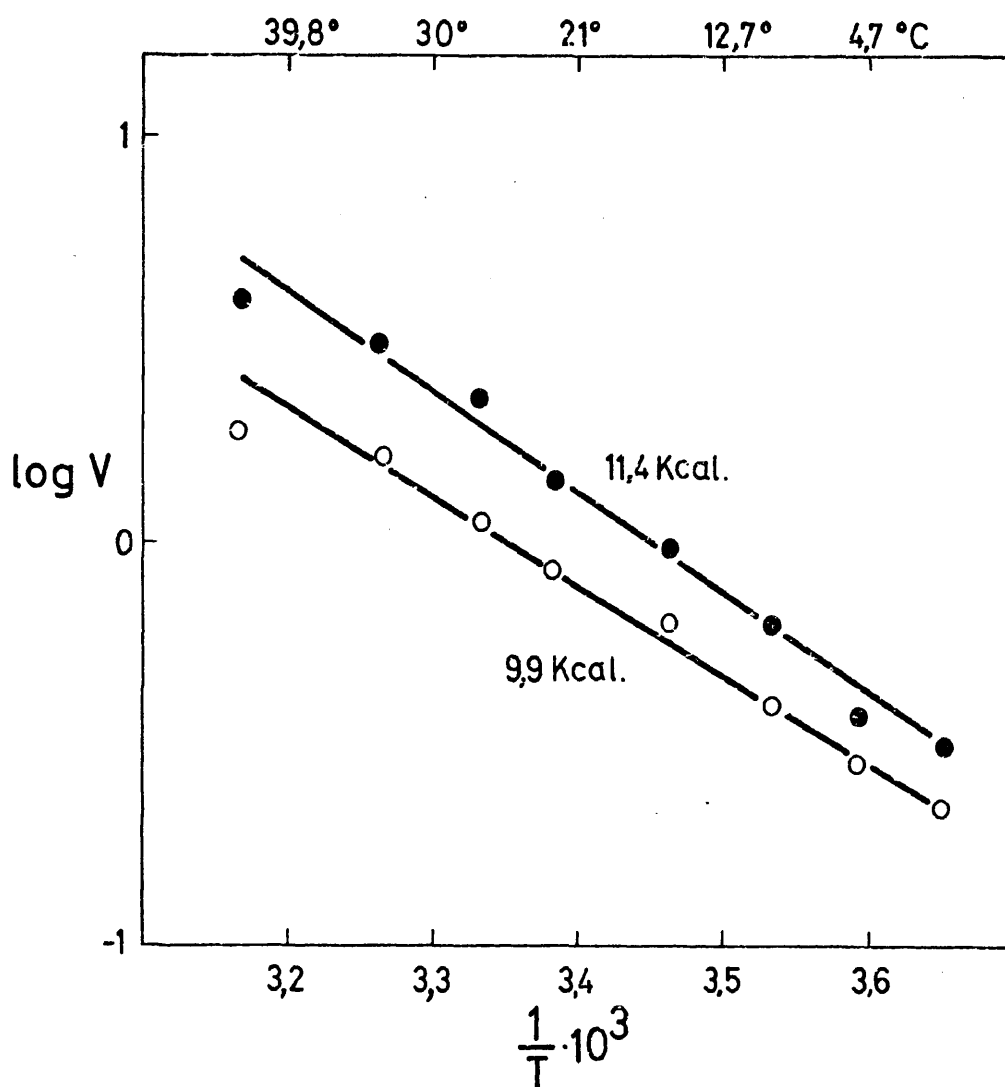


Fig. 66 - Representación de Arrhenius para la ATPasa soluble. La experiencia fué realizada en idénticas condiciones que la de la Fig. 65. Los resultados no evidencian cambio de pendiente a lo largo de las temperaturas estudiadas. ○-○ actividad ensayada en ausencia de tripsina, ●-● con tripsina en el medio de reacción.

brana bacteriana y la Fig. 66 presenta una experiencia similar realizada con ATPasa soluble. Los datos obtenidos están de acuerdo con los anteriores y los complementan. La ATPasa unida a la membrana da lugar a una representación de Arrhenius con dos pendientes encontrándose la temperatura de cambio alrededor de 18°C. La energía de activación por debajo de ese punto fué calculada en 30,5 Kcal/mol, y por encima en 9,8 Kcal/mol. La ATPasa soluble da lugar a una sola pendiente. Su energía de activación es un poco distinta según se trate de la enzima ensayada en presencia o ausencia de tripsina. Con la proteasa en el medio de reacción la energía de activación fué determinada en unas 11,4 Kcal/mol y sin la tripsina en 9,9 Kcal/mol. Esta pequeña diferencia puede responder al efecto de la temperatura sobre la tripsina y mediatamente sobre la ATPasa soluble. La dificultad de no encontrarse esta diferencia en la enzima unida a la membrana puede no ser significativa, por cuanto la concentración de proteína, sustrato de la tripsina, es mucho mayor en la membrana que en la fracción soluble, lo que originaría diferencias en la energía de activación muy pequeñas que caerían dentro del error experimental. Nuestros hallazgos para la ATPasa unida a la membrana concuerdan en absoluto con los obtenidos por Sweetman y col. (209), sin embargo la energía de activación que nosotros hemos calculado para la enzima soluble es bastante inferior a la hallada por Davies y col (118).

La existencia de enzimas con una representación de Arrhenius compuesta de dos pendientes distintas y por consiguiente con dos ener-

gías de activación diferentes ha demostrado ser un hecho bastante generalizado cuando se trata de enzimas asociados a sistemas membranosos. ATPasa activada por Na^+ y K^+ de microsomas de cerebro (210) presenta dos líneas rectas que se cruzan a 20°C con energías de activación de 30 Kcal/mol por debajo de cambio de pendiente y 15 Kcal/mol por encima. Cuando la preparación se trata con fosfolipasa A, la representación de Arrhenius da una sola pendiente con energía de activación 30 Kcal/mol. ATPasa activada por Na^+ y K^+ de riñón de cordero muestra un cambio a 20°C con una energía de activación por encima de esta temperatura de 15,2 Kcal/mol y por debajo de 32,6 Kcal/mol (211). La ATPasa mitocondrial de hígado de rata también muestra una discontinuidad en la representación de Arrhenius alrededor de 23°C (219). Las energías de activación son de 29 Kcal/mol y 8 Kcal/mol según se trate de temperaturas inferiores o superiores a la zona de cambio de pendiente.

No solo las ATPasas están afectadas por estas discontinuidades en las representaciones de Arrhenius, otras enzimas asociadas a membranas presentan idénticas características. La succínico oxidasa mitocondrial tiene un cambio de pendiente a 17°C (214),

La interpretación de este fenómeno ampliamente extendido, también se ha ido generalizando. Los lípidos de la membrana presentan a bajas temperaturas una estructura L_β , que con el incremento de temperatura llega a perder su rigidez debido a la fusión de los lí

pidos, dando lugar a una estructura conocida como L_{β}' menos rígida y ordenada que la L_{β} . El punto de fusión va a depender de la naturaleza de los lípidos. La cantidad de esteroides, la longitud de las cadenas parafínicas, su grado de insaturación, conformaciones trans en los dobles enlaces, son factores que determinan un incremento positivo en el punto de fusión (25). Como consecuencia de esto, las enzimas se encontrarán en una situación física muy distinta por debajo del punto de fusión de los lípidos que por encima. Ello los lleva lógicamente a una alteración en la energía de activación.

La coincidencia entre el cambio de continuidad en la representación de Arrhenius y la temperatura de fusión de los lípidos ha sido confirmado en algunos casos. Kimelberg y col (215) demostraron que preparaciones deslipidizadas de ATPasa activada por Na^+ y K^+ , eran activadas por dipalmitoil fosfatidilglicerol con una máxima actividad cuando las cadenas parafínicas estaban más fluidas. La representación de Arrhenius presentaba una discontinuidad a 32 °C que coincide con la temperatura de fusión de los fosfolípidos añadidos. Grisham y col. (211) encontraron que el cambio de energía de activación para la ATPasa activada por Na^+ y K^+ de riñón de cordero, coincidía exactamente con la fusión de los lípidos de la membrana estudiada con marcadores de spin.

En conclusión las transiciones termotrópicas que tienen lugar en la región hidrofóbica de los lípidos de membrana de E. coli son

las responsables del cambio de energía de activación que ocurre a 18 °C, en la ATPasa unida a la membrana. Mientras que la ATPasa soluble, desprovista en su mayor parte de lípidos, no presenta ese cambio de energía característico de enzimas asociados a membranas.

Fijación de ATP a la ATPasa

La fijación de ATP a la ATPasa de E. coli fué estudiada en sus dos estados de particulada y soluble. La Fig. 67 muestra los resultados de la fijación a la ATPasa asociada a la membrana. La representación de Scatchard (181) da lugar a dos pendientes cuyas constantes de disociación son $8 \cdot 10^{-8}$ M a bajas concentraciones de ATP, y $4,3 \cdot 10^{-7}$ M a altas concentraciones. La fijación parece ser un fenómeno independiente de la presencia de Magnesio puesto que experiencias efectuadas con el catión en el medio de reacción no se diferencian aparentemente de éstas. El valor de estas constantes concuerda con otros encontrados por diferentes investigadores para fijación de ATP a la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , Hegyvary y col. (237) y Norby y col. (238) obtuvieron constantes de disociación $0,22 \mu\text{M}$ y $0,12 \mu\text{M}$ respectivamente aunque con la diferencia de que estos autores encontraron un solo tipo de afinidad para el ATP.

Experiencias de fijación de ADP a ATPasa mitocondrial rindieron unos resultados bastante similares. Hilborn y col. (239) encontraron dos sitios con afinidades distintas en presencia de Mg^{2+} . El sitio de mayor afinidad tenía una constante de disociación $0,28 \mu\text{M}$ mientras que para el de menor afinidad la K_{dis} era $47 \mu\text{M}$.

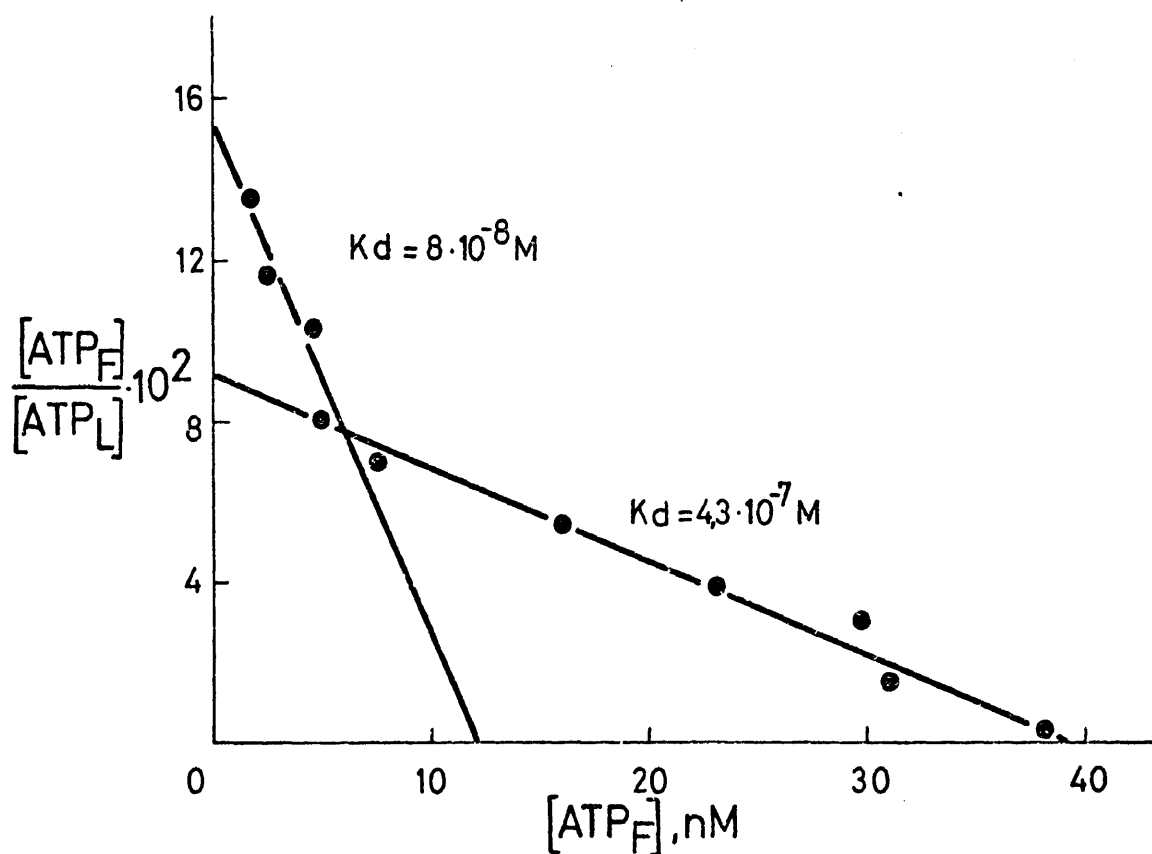


Fig. 67 - Representación de Scatchard para la fijación de ATP a la ATPasa asociada a la membrana. En ordenadas se representan moles de ATP fijada a la ATPasa divididos por moles de ATP libre en el medio de reacción y en abscisas moles de ATP fijados. El medio de reacción contenía 1 mg de proteína de membrana y cantidades crecientes de ATP - ^{14}C . Las demás condiciones se encuentra en Materiales y Métodos.

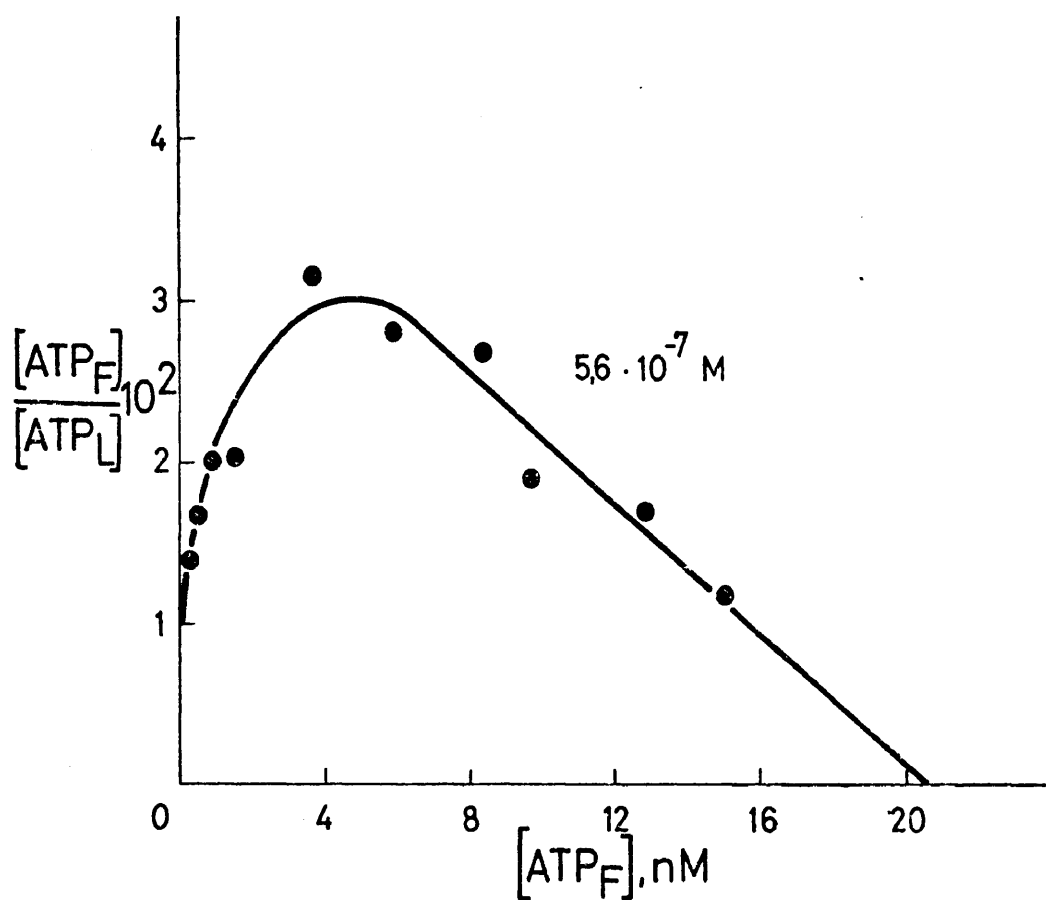


Fig. 68 - Fijación de ATP a la ATPasa soluble de *E. coli*. La representación de Scatchard presenta una clara cooperatividad positiva. El medio de reacción contenía 0,5 mg de proteína soluble.

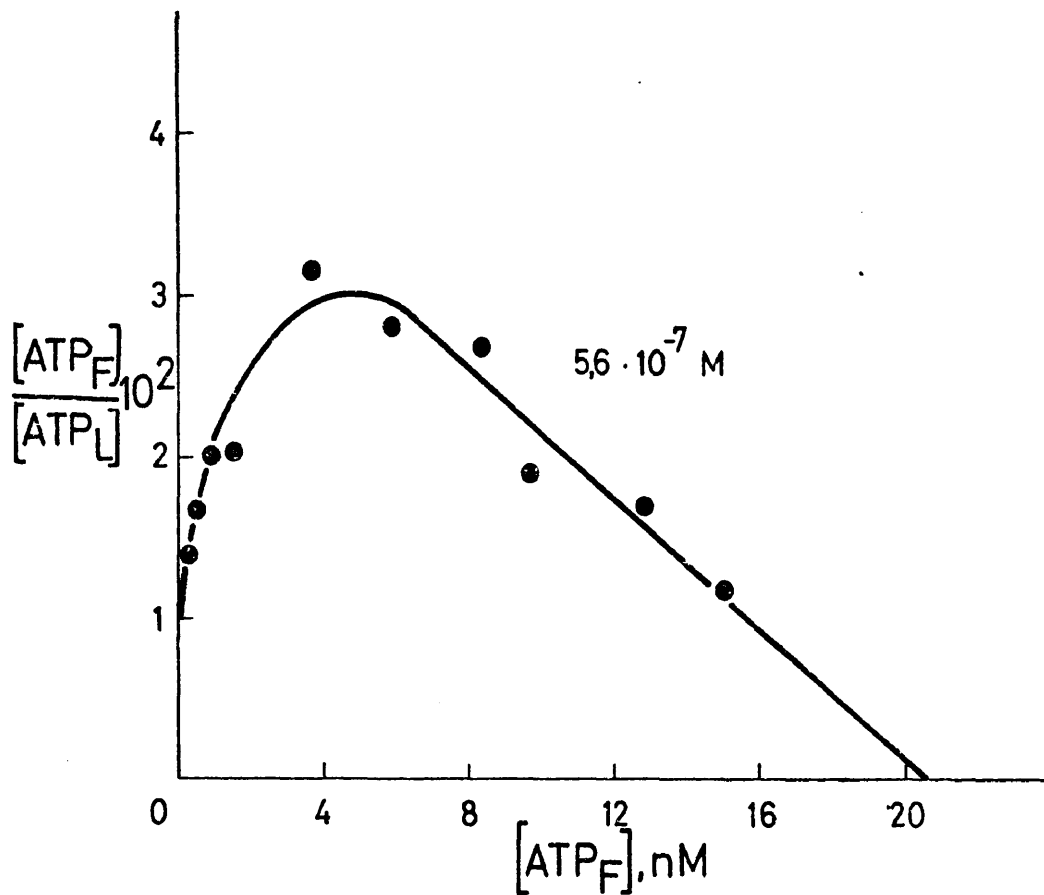


Fig. 68 - Fijación de ATP a la ATPasa soluble de *E. coli*. La representación de Scatchard presenta una clara cooperatividad positiva. El medio de reacción contenía 0,5 mg de proteína soluble.

La ausencia de Mg^{2+} debilitaba la fijación al sitio de mayor afinidad pero dejaba inalterado el segundo.

Los resultados de Catterall y col. (240) presentan una K_{dis} para la fijación de ADP a la ATPasa mitocondrial en ausencia de Mg^{2+} $0.94 \mu M$.

Los trabajos de fijación de ADP fueron realizados con ATPasa purificadas hasta homogeneización.

Nuestros resultados de fijación de ATP a la ATPasa soluble se presentan en la Fig. 68. La representación de Scatchard da lugar a una gráfica con neta cooperatividad positiva. La constante de disociación es $5,6 \cdot 10^{-7} M$, muy semejante a la de la ATPasa ligada a la membrana. Esta experiencia fué hecha en ausencia de Mg^{2+} , si bien la inclusión del catión no parece alterar los resultados.

La cinética de saturación de sustrato expuesto más arriba, encuentra una considerable confirmación en estos hallazgos. La ATPasa asociada a la membrana sugería la presencia de dos sitios para el sustrato con afinidades distintas, cosa que los estudios de fijación corroboran. Sin embargo, debemos notar que el problema de la heterogeneidad de sitios o la cooperatividad negativa no está resuelta.

La ATPasa soluble fija ATP siguiendo una cinética que implica cooperatividad positiva entre los sitios, lo que también concuerda con la cinética de velocidades iniciales para el sustrato. De esto podemos concluir que, a pesar de cortas diferencias que comentaremos

más tarde, los estudios de fijación son una buena confirmación de los datos de cinética de velocidades iniciales que antes hemos comentado.

DISCUSION

Los componentes que integran la estructura de una membrana celular están específicamente definidos por su relación con los restantes componentes y por su función. La arquitectura de la membrana no es caótica, sino altamente ordenada, dentro de la libertad que cada una de sus partes necesita para la misión que le cumple - desempeñar en el todo.

Esto implica que cualquier manipulación con la membrana, aunque sea muy suave, puede alterar las condiciones que envuelven una enzima determinada, y cambiar ligera o drásticamente sus propiedades funcionales y moleculares.

Teniendo en cuenta estas limitaciones hemos emprendido - el trabajo de solubilizar la ATPasa de E.coli, utilizando métodos suaves de solubilización en dos preparaciones de membranas con características distintas; las que hemos llamado vesículas y las denominadas simplemente membranas. El motivo de usar las vesículas y las membranas en experiencias idénticas se desprende de lo que acabamos de decir. Los métodos de preparación de unas y otras son distintos; el rendimiento final de proteínas es diferente; la morfología - muestra que los cambios ocurridos durante la elaboración de vesículas y membranas han afectado de modo desigual a los dos sistemas.

Esta patente diversidad de efectos observables pudiera expresarse a nivel molecular en alteraciones funcionales de algunos enzimas como por ejemplo la ATPasa. Nuestro interés al elaborar un nuevo tipo de preparación de membranas se cifraba esencialmente en la obtención de una membrana plasmática de E.coli, que no hubiese sido fragmentada en las manipulaciones de preparación, que estuviese en su mayoría libre de contaminantes de la envoltura celular y que conservase al máximo su integridad nativa. Condiciones todas estas que, parecen haber sido logradas en gran parte. Sin embargo cuando comparamos el comportamiento de membranas y vesículas por lo que atañe a la enzima objeto de nuestro estudio, no obtuvimos diferencias dignas de ser reseñadas. Sorprendentemente las grandes diferencias morfológicas no estaban acompañadas de cambios claramente significativos por lo que respecta a las propiedades de la ATPasa.

Un aspecto de notable interés relacionado con los dos tipos de membranas que comparamos es la orientación de las mismas. La fragmentación de la membrana durante la lisis y la subsiguiente formación de vesículas con los fragmentos, podría dar lugar a una inversión de la membrana, de tal manera que las vesículas tuvieran la cara interior de la membrana bacteriana hacia el exterior. Kaback (116) afirma que no es significativo el número de vesículas invertidas como se desprende de estudios microscópicos de criocorrosión y de contraste de fase observables durante la lisis.

Estudios más recientes (216) han venido a corroborar en parte este aserto. Vesículas obtenidas mediante sonicación y tratamientos mecánicos se encuentran esencialmente invertidas. Sin embargo, las obtenidas por la acción simultánea de EDTA y lisozima sólo parcialmente han sufrido la inversión. Este hecho puede ser explicativo de la ausencia de características diferenciales entre la ATPasa de vesículas y la de membranas. Ambas conservan su disposición natural, al menos de forma mayoritaria, y la mayor fragmentación ocurrida en las vesículas no ha ocasionado alteraciones detectables en la función de la ATPasa si la comparamos con la estudiada en las membranas. Parece lógico pensar que la múltiple rotura de la membrana y la eliminación de gran cantidad de proteínas habrán dejado la ATPasa asociada a las vesículas más expuesta y accesible a cualquier tipo de componente que pueda interaccionar con ella. Por esta razón las pequeñas diferencias encontradas son fácilmente explicables teniendo en cuenta el menor rendimiento protéico que lográbamos en la preparación de vesículas y la mejor exposición que debe presentar la ATPasa tanto a su propio sustrato como a los agentes de solubilización.

La solubilización selectiva de la ATPasa ha sido estudiada sistemáticamente en vesículas y membranas. Diversas actividades enzimáticas asociadas a membranas y concretamente ATPasas han sido solubilizadas mediante repetidos lavados con soluciones salinas de baja fuerza iónica (167, 168, 149). La ATPasa de E.coli no se obtiene en forma soluble cuantitativamente satisfactoria cuando se aplican tratamien

los similares. Existe una considerable diferencia entre la cantidad de enzima solubilizado con Tris 100 mM y 3 mM; no obstante, en ningún caso la bajada de la fuerza iónica y los lavados repetidos rinden una actividad total de la ATPasa comparable a la actividad de la proteína ligada a la membrana. La concentración de proteína en el medio de solubilización es otro factor importante. De acuerdo con Abrams (168) la dilución de la proteína de membrana favorece la liberación de la enzima, pero nunca hasta tal punto que podamos extraer prácticamente toda la ATPasa. En el mejor de los casos, una actividad total del 40 ó el 50% de la actividad de la membrana permanece unida a los sedimentos residuales.

Este comportamiento es indicativo de que las condiciones que estabilizan la asociación de la ATPasa a las membranas de Micrococcus luteus (149), Bacillus megaterium (157) y Streptococcus faecalis (168) son distintas de las que existen en E. coli. La ATPasa de este gram negativo no se une a la membrana esencialmente a través de enlaces hidrofóbicos, ni de interacciones iónicas simples; la asociación establece una especificidad de asociación que lleva implícita una estructura de membrana para E. coli distinta, al menos en algunos aspectos, de la estructura gram positiva.

La extraordinaria concentración de iones Mg encontrada en la membrana de Micrococcus luteus (160) nos hizo pensar que los cationes divalentes podrían constituir los puentes fundamentales de unión de la ATPasa de E. coli con la membrana. En efecto, los hechos

comprobaron esta suposición. Una concentración de EDTA 3 mM tamponado con bicarbonato amónico al principio, y posteriormente con Tris 50 mM, a pH alcalino, rindió los mejores resultados. Por este medio obtuvimos una solubilización de ATPasa, selectiva y prácticamente total. Después de la solubilización se observaba un incremento en la actividad total de la enzima, y la ATPasa soluble daba cuenta al menos del 90% de las unidades totales incrementadas. La actividad específica se elevaba de 8 a 10 veces con respecto a la actividad original de la enzima unida a la membrana. Este efecto era conseguido con un sólo lavado de las membranas a concentración de 1 mg de proteína por mil de líquido de extracción y 0,5 mg/ml cuando se trataba de vesículas. La cantidad de proteína total solubilizada con la ATPasa oscilaba entre el 15 y el 20% o entre el 25 y el 30%, según se utilizara $\text{CO}_3\text{H}\text{NH}_4$ o Tris respectivamente como tampones de solubilización.

Todo esto es claramente conclusivo de que la ATPasa de E.coli está asociada a la membrana a través de puentes formados por cationes divalentes, en especial magnesio, puesto que el EDTA es un quelante específico de cationes magnesio. Pudiera suceder que no fuera la ATPasa molecular lo que nosotros solubilizásemos, sino la enzima y algo más, íntimamente ligado con ella. En tal caso la acción de los cationes divalentes podría no afectar directamente a la ATPasa. Sin descartar esta posibilidad podemos presentar algunos hechos que la hacen menos probable: 1.- La enzima soluble centrifugada a $125000 \times g$ durante 30 min. da lugar a un sobrenadante totalmente transparente que

contiene toda la actividad enzimática y a un sedimento compuesto de lípidos y otras proteínas pero sin actividad. 2.- La fracción soluble presenta un comportamiento electroforético para la ATPasa, típico de una proteína soluble. 3.- La filtración por Sephadex G-200 o Sepharosa 4 B permite deducir un peso molecular aproximado de 300,000 daltones que coincide, en general, con el de otras ATPasas purificadas (171, 172, 170). 4.- El análisis de aminoácidos de otras ATPasas muestra una gran preponderancia de aminoácidos ácidos (170, 171, 172, 217). Esta última afirmación constituye una prueba muy indirecta y frágil, pero puede ser ilustrativa de una interacción directa entre la ATPasa y los cationes divalentes. Por todo esto nos inclinamos a pensar que la ATPasa solubilizada con EDTA 3 mM se puede considerar como una enzima soluble, de acuerdo con los criterios más corrientemente aceptados en esta materia.

Las técnicas desarrolladas para la preparación de membranas y las corrientemente utilizadas en la obtención de vesículas de E. coli, hacen uso del EDTA para separar y fragmentar en parte la membrana exterior de la bacteria. Este tratamiento es anterior a la lisis de los esferoplastos y en consecuencia no tiene efecto alguno sobre la ATPasa. Los sobrenadantes obtenidos después de tratar las células bacterianas con EDTA no manifiestan actividad ATPásica, lo que supone que esta enzima se encuentra situada en la cara interna de la membrana plasmática. Los resultados de Futai (216) confirman plenamente esta afirmación, al demostrar que la ATPasa de esferoplastos

de E.coli no se inhibe por antisueros específicos, mientras que sí lo hace una vez que las membranas se han roto.

Comparada con esta solubilización selectiva parece útil considerar la acción de algunos detergentes en la extracción de la ATPasa. Sin entrar en los detalles ampliamente expuestos en Resultados, podemos afirmar que el desoxicolato, el dodecil sulfato, el Nonidet y el Triton X-100, no proporcionan una solubilización selectiva de la ATPasa. Las razones son inmediatas. La cantidad de proteína de membrana solubilizada se encuentra alrededor del 50% de la proteína total, aunque con notables oscilaciones según el tipo de detergente. La actividad total determinada en extractos y sedimentos residuales es de ordinario inferior a la actividad de la membrana original. La actividad correspondiente a las fracciones solubles representa como máximo el 60% de la actividad total, calculada en la fracción soluble e insoluble. Las precedentes afirmaciones son suficientes para poder deducir que el uso de detergentes no representa un medio apto para conseguir una liberación de la ATPasa de E.coli, selectiva y suave, de manera que la enzima mantenga su estructura y propiedades nativas.

La NADH₂-deshidrogenasa es otra enzima de membrana, pero su asociación en E.coli es extremadamente débil. En condiciones normales, el citoplasma celular arrastra como mínimo el 80% de la actividad enzimática total. Se necesita proteger la asociación de la enzima a la membrana cuando se la quiere solubilizar con menos cantidad de pro-

teínas contaminantes. Esta protección se puede conseguir eficazmente añadiendo iones Mg al medio de lisis de los esferoplastos en condiciones apropiadas, como se descubre en Resultados. La espermidina, una triamina, ejerce un efecto semejante al magnesio e incluso más eficaz. Ambos agentes favorecen la unión entre la NADH -deshidrogenasa y la membrana plasmática aparentemente por un mecanismo idéntico. El Mg^{2+} y la espermidina permiten la formación de puentes entre sustancias con cargas negativas, De aquí se deduce que el modo ordinario de unirse la NADH -deshidrogenasa a la membrana de E. coli se lleva a cabo a través de cationes divalentes. En este sentido la NADH -deshidrogenasa se asemeja a la ATPasa, pero la asociación de la última a la membrana es mucho más fuerte, lo que pudiera indicar que además de cationes divalentes, en la ATPasa actúan otras fuerzas, quizás hidrofóbicas, quizás simplemente iónicas pero más intensas. Aparte del tipo de enlaces y de su intensidad, la diferencia que observamos entre estas dos enzimas, puede ser el reflejo de la estructura de los sitios específicos que cada proteína ocupa en la membrana. La ATPasa pudiera encontrarse profundamente incrustada entre las proteínas integrales de la membrana, lo que la pondría a cubierto de una fácil solubilización, mientras que la NADH -deshidrogenasa se situaría entre las proteínas periféricas fácilmente accesibles a cualquier cambio ambiental. Esta interpretación estaría probablemente de acuerdo con las funciones asignadas a cada enzima en el metabolismo celular. Posibles problemas de fosforilación oxidativa y sobre todo fenómenos de transporte parecen

postular para la ATPasa una localización profunda dentro de la estructura de la membrana, en tanto que las enzimas responsables de los procesos oxidativos y transporte de electrones se encontrarían adheridas a la su perficie interior de la membrana, directamente en contacto con los meta bolitos del citoplasma que los sirven de sustrato.

Los cationes magnesio y la espermidina protegen la asociación de la NADH -deshidrogenasa a la membrana, pero nunca de una forma absoluta. Aproximadamente un 35% de la enzima es liberada con la fracción citoplásmica aun a altas concentraciones de Mg^{2+} . El efecto de la espermidina a concentraciones iguales a las de Mg^{2+} , permite só lo una solubilización de un 15%. Estos datos parecen indicar la existen cia de una considerable cantidad de NADH -deshidrogenasa cuya unión a la membrana no se efectúa mediante puentes de cationes divalentes, o bien que esos puentes no se llevan a cabo directamente con la enzima, sino con algún componente de naturaleza protéica o lipídica que la - NADH -deshidrogenasa ha perdido en las manipulaciones de lisis osmó tica. La mayor eficacia de la espermidina puede radicar en su mayor tamaño; pero más probablemente en su capacidad de interaccionar direc tamente entre la enzima y los integrantes de la membrana plasmática.

Formas diferentes para la NADH -deshidrogenasa al Bacillus megaterium han sido postuladas por Mizushima (218) quien solubilizó la enzima con suvaes tratamientos alcalinos, encontrando que el 70% de la enzima total, que constituía la fracción soluble, era mucho más resisten te a los ácidos que el 30% que permanecía asociada a la membrana. -

Nuestros resultados no sugieren la existencia de dos enzimas distintas en ningún caso; al mismo tiempo pensamos que la diferencia de sensibilidad o resistencia a condiciones ambientales diversas de una enzima al estado soluble o ligada a la membrana; no implica dos formas diferentes de la enzima. Hoy día se conocen numerosas propiedades alotópicas adscritas a una misma enzima, que pueden dar cuenta satisfactoria de las divergencias halladas por Mizushima.

Muñoz y col.⁹ (143), después de preparar membranas de Micrococcus lysodeikticus por métodos normales, encontraron que las membranas conservaban más del 80% de la actividad NADH -deshidrogenásica. Esta actividad podía ser solubilizada mediante técnicas suaves, como desoxicolato al 1% o EDTA 1 mM. Estos resultados indujeron a los autores a afirmar que la enzima se encontraba asociada a la membrana, esencialmente a través de enlaces iónicos de tipo cationes divalentes, a diferencia de la ATPasa del mismo microorganismo que también disponía de fuertes interacciones hidrofóbicas. En consecuencia la NADH -deshidrogenasa era una auténtica enzima de membrana (145), cuya solubilización se podía impedir totalmente, sin alterar la actividad enzimática, tratando la membrana con glutaraldehído al 0,5% (219).

Estos resultados propugnan una diferencia radical de interacciones enzima-membrana para la NADH -deshidrogenasa de Micrococcus lysodeikticus y Escherichia coli. Aquella está, íntimamente asociada a la membrana y puede solubilizarse por métodos suaves y selectivos. La de E. coli necesita ser protegida para su permanencia en la

membrana, y su posterior solubilización con EDTA es inmediata. Teniendo en cuenta la cantidad de proteína (ver Resultados) que el Mg^{2+} y la espermidina mantienen adherida a la membrana celular, se podría llegar a dudar sobre la verdadera catalogación de la NADH₂-deshidrogenasa de E.coli como enzima de membrana o enzima citoplásmica. En cualquier caso queda patente una nueva diferencia al menos estructural, y posiblemente reflejo de propiedades funcionales distintas entre un microorganismo gram positivo como Micrococcus lysodeikticus y uno gram negativo como E.coli.

La estabilidad de la ATPasa soluble ha sido un problema estudiado con interés y detalle a lo largo de este trabajo. Factores de diversa índole han sido manejados y variados en la esperanza de encontrar una solución a la inestabilidad de la enzima. Indudablemente temperaturas próximas a cero grados causan una inactivación muy rápida de la fracción soluble. Temperaturas de 37 °C son también drásticamente inactivantes. Las causas pueden ser distintas. Creemos que el frío inactiva la ATPasa de E.coli al estado soluble, por una disociación de la proteína en sus componentes más pequeños que, con posterioridad, pudieran formar agregados de distintos tamaños. Este mecanismo sería idéntico al que acontece a temperatura ambiente y que hemos descrito ampliamente en Resultados, con la diferencia de que la inactivación a 20 °C es mucho más lenta. La pérdida de actividad que ocurre a 37 °C y temperaturas superiores puede ser debida a varias causas: 1.- Presencia de una proteasa que se ha solubilizado con la ATPasa y la digiera rápidamente.

damente en condiciones favorables; 2.- Desnaturalización de la enzima por efecto del calor, no detectable en tiempos cortos como los empleados en ensayos de actividad, pero ya perceptible en periodos de una hora y superiores; 3.- Disociación de la enzima semejante a la que ocurre a 0 °C y temperatura ambiente, si bien acelerada por efecto del calor. Es probable que, salvo a temperaturas muy elevadas, el mecanismo de inactivación en dependencia de la temperatura sea idéntico en todos los casos. Sin embargo, apoyados en los datos de que disponemos sólo podríamos afirmar que la enzima se inactiva por disociación y posterior formación de agregados cuando este proceso tiene lugar a temperatura ambiente o a 0 °C.

Posiblemente el factor dilución desempeñe un importante papel en la inactivación de la enzima. Ello parece lógico si tenemos en cuenta que la inactivación de la ATPasa es fruto de su disociación proteica y que la dilución está desplazando el equilibrio hacia una disgregación de la proteína, mientras que el incremento de concentración favorecería el desplazamiento en el sentido inverso.

La ATPasa asociada a la membrana es muy estable incluso a bajas temperaturas. Por consiguiente, la labilidad acusada por la fracción soluble es debida a la privación de su sitio específico de unión a la membrana o a la acción de agentes externos añadidos en la extracción. Intentos por proporcionar a la ATPasa soluble un medio que de alguna manera pudiera suplir los efectos de la membrana, dieron solo rendi-

mientos muy parciales. En este sentido nuestros resultados están en discordancia con los de Evans (146). Experiencias muy recientes en nuestro Laboratorio (220) han demostrado que el EDTA empleado en la solubilización favorece la inactivación de la enzima. De hecho, la eliminación de este quelante de la fracción soluble, y la adición de pequeñas concentraciones de cationes divalentes como el Mg^{2+} , retardan considerablemente la pérdida de actividad sin que resuelvan definitivamente el problema de la estabilidad de la enzima. La existencia de ATPasas solubles, extremadamente lábiles al frío, ya ha sido mencionada. Cloroplastos (165), Mitocondrias (162, 163, 164) *Bacillus megaterium* (166, 167), *E. coli* (118, 146) son ejemplos de esta labilidad. *Streptococcus faecalis* (168) y *Micrococcus lysodeikticus* (138) son por el contrario microorganismos cuyas ATPasas son perfectamente estables en su forma soluble e incluso purificada. Ignoramos la razón de esta diferencia. Es curioso constatar la similitud existente entre la estructura cuaternaria de las ATPasas conocidas (171, 172, 221, 222). La diferencia de estabilidad no parece provenir de la distinta composición de subunidades ya que todas presentan unos modelos bastante parecidos si hacemos excepción de la de *S. faecalis* (170). Sin embargo, la diferencia existe y su explicación debe radicarse en la distinta disposición de las subunidades y sus mutuas interacciones, y últimamente en las exigencias fisiológicas de cada organismo, genéticamente determinadas.

La ATPasa ha sido purificada sin que podamos precisar exactamente cuántas veces. Estudios de purificación en que la enzima no se

protegía con ningún agente estabilizante, ni se eliminaba el EDTA dieron un enriquecimiento de 16 veces a partir de la enzima soluble y dos días después de la solubilización. Estas conclusiones son ficticias puesto que la enzima se está disociando rápidamente, sobre todo teniendo en cuenta la gran dilución a que está sometida en el eluida de las columnas empleadas en la filtración por gel. En la realidad la actividad enzimática que medimos responde solo a una parte de la enzima, aquella que se encuentra en las condiciones nativas.

Las aplicaciones precedentes parecen un poco especulativas, sin embargo no lo son. Trabajos posteriores del Laboratorio (220) hechos en condiciones de protección de la estabilidad de la enzima y eliminación del EDTA, han confirmado nuestras predicciones. En este caso se han obtenido enriquecimientos de 70 y 80 veces, aun sin haber logrado una estabilidad total de la ATPasa. Por consiguiente podemos afirmar que la enzima ha sido purificada, pero la cantidad de proteína nativa de que podemos disponer está limitada por su disociación constante en las condiciones de trabajo.

El deseo de comprender el mecanismo de la estimulación por tripsina de la ATPasa, nos llevó a estudiar los efectos de la proteasa en las más variadas condiciones en que hemos determinado actividad ATPásica. Los resultados no correspondieron plenamente al esfuerzo, pero disponemos de valiosas indicaciones que nos permiten aproximarnos a la solución del problema.

12.- La estimulación por tripsina de la ATPasa asociada a la membrana no obedece a una situación de cripticidad de la enzima como podría parecer lógico, teniendo en eucneta lo expuesto al hablar de la solubilización. La ATPasa soluble e incluso la purificada conservan la propiedad de ser estimuladas en una proporción cuantitativamente semejante a la de la enzima ligada a la membrana. Ello implica que la tripsina es timula la actividad enzimática de la ATPasa por una acción directa sobre su molécula o sobre un componente protéico íntimamente asociado con ella.

22.- Con independencia del estado en que se halle la ATPasa, a mayor concentración de proteína se advierte una mayor estimulación por tripsina. Enzima asociada a la membrana, soluble y purificada guardan una relación directa entre la dilución de proteína en el medio de reacción y el efecto estimulante de la proteasa. La progresiva pérdida de estimulación con la dilución de las muestras revierte totalmente cuando se concentran de nuevo.

32.- Detergentes como el dodecil sulfato sódico y el desoxicolato sódico anulan la estimulación por tripsina en sus fracciones solubles, mientras que detergentes no iónicos como el Nonidet y el Tritón X-100 no producen este efecto supresor.

42.- La fuerza iónica de las fracciones solubles parece tener alguna relación con la acción de la tripsina. Fracciones preparadas a altas concentraciones de Tris muestran un efecto estimulante considerablemente reducido. Sin embargo esta conclusión tiene poca relevancia puesto que la

actividad ATPásica de las fracciones a alta fuerza iónica es bastante baja, y en tales condiciones los resultados experimentales son menos exactos y reproducibles.

52.- La K_m para el sustrato, entendiendo por tal el magnesio y el ATP en relación 1 : 2, no se altera por la presencia de tripsina en el medio de reacción, pero sí la V_m que experimenta un aumento próximo al 100%. Por consiguiente la tripsina no afecta a la afinidad de la enzima por el sustrato sino únicamente a la velocidad de ruptura del complejo en enzima libre y productos finales.

62.- La saturación de Mg^{2+} a concentración de ATP constante, para la ATPasa unida a la membrana y soluble, presenta una K_m más alta en presencia de tripsina que en ausencia, lo que indicaría que la acción de la proteasa está disminuyendo la afinidad de la ATPasa por el Mg^{2+} .

Estas conclusiones guardan estrecha relación con las obtenidas en Micrococcus lysodeikticus (138, 160, 223) pero también acusan divergencias de consideración. La actividad básica de la ATPasa asociada a la membrana de E.coli es mucho más grande que la de M.lysodeikticus en idénticas condiciones; las preparaciones solubles de E.coli en general, lo mismo que las purificadas conservan la estimulación por tripsina, sin embargo la ATPasa purificada de M.lysodeikticus pierde totalmente esta característica (171).

En 1963 Pullman y col. (154) purificaron un componente protéico que acompañaba a la ATPasa mitocondrial y que era un inhi-

bidor de su actividad. Tenía 15.000 daltones de peso molecular y confería estabilidad en frío a la enzima, cuando se asociaba con ella. Su papel fisiológico no fué dilucidado aunque se le supone implicado en la regulación de la ATPasa.

La ATPasa de Cloroplastos (155) presenta un efecto idéntico. Una subunidad de peso molecular 13000 acompaña a la enzima actuando como inhibidor. Su composición en aminoácidos es distinta de la mitocondrial, su hidrofobicidad mucho mayor y la especificidad de ambos por sus enzimas respectivos es muy grande.

Subunidades adicionales a las dos mayoritarias encontradas por Salton y col. (156) en la ATPasa Micrococcus lysodeikticus, han inducido a estos autores a suponer que, dada su semejanza en peso molecular con las subunidades inhibidoras de mitocondrias y cloroplastos, podrían desempeñar algún papel regulador sobre la ATPasa del microorganismo. De donde puede seguir que alguna de esas subunidades podría ser un inhibidor de la actividad ATPásica. La estimulación por la tripsina consistiría únicamente en la destrucción de ese inhibidor. Sin embargo esta consideración no parece probable, puesto que recientes trabajos en nuestro Laboratorio (224) más bien indican que la tripsina ejerce su acción sobre una de las dos subunidades de mayor peso molecular y no sobre los componentes minoritarios de la molécula.

El mecanismo por el cual la ATPasa de E. coli es estimulada por tripsina no ha sido aun completamente esclarecido. Nuestros datos experimentales nos permiten establecer paralelismo con otros siste-

mas, pero también nos obligan a admitir manifiestas divergencias.

El efecto de la tripsina debe recaer sobre un componente de la estructura cuaternaria de la ATPasa que, hipotéticamente catalogamos como regulador, y cuya regulación es independiente del estado en que se encuentre la ATPasa. A diferencia de otros sistemas (154, 155, 156) ese componente o subunidad está íntimamente asociado con la ATPasa, de tal manera que no se separa de ella mas que en condiciones que alteran las propiedades enzimáticas de la proteína.

Por otra parte existe una estrecha relación entre uno de los sitios de fijación del Mg^{2+} y el lugar de acción de la tripsina. El descenso de afinidad para el Mg^{2+} en presencia de la proteasa nos está sugiriendo que la tripsina destruye o altera de alguna manera el sitio de fijación del catión. Hay que notar que el efecto producido por la tripsina puede ser cuantitativamente muy pequeño. La rotura de un enlace o un simple cambio en la conformación de la ATPasa pueden ser suficientes. De acuerdo con esto, podemos pensar que la ATPasa tiene una subunidad que resulta inhibidora de la actividad enzimática cuando el catión se fija a ella. La acción de la tripsina sobre esa subunidad, eliminaría el efecto de la fijación del magnesio, reflejado en el descenso de afinidad global, y consecuentemente produciría una aparente estimulación de la actividad hidrolítica. Esta explicación puede ser falsa, pero de momento satisface los datos experimentales de que disponemos, y postula un posible complicado sistema de regulaciones para la ATPasa de E. coli. No parece improbable que, dadas las variadas funciones que se atribuyen

a esta enzima, su actividad esté controlada por complejos y precisos mecanismos de regulación.

Hemos demostrado que la relación que debe existir entre la concentración de Mg^{2+} y de ATP en el medio de reacción es que haya 1 mol de catión por cada 2 moles de ATP. En ausencia de Mg^{2+} la velocidad de hidrólisis es indetectable, al menos en tiempos cortos de reacción. Una vez alcanzada esa relación de $Mg^{2+}/ATP = 0.5$, la velocidad de reacción llega a un óptimo. Cuando esa velocidad de reacción corresponde al sustrato óptimo en que toda la enzima se encuentra saturada, nuevos incrementos en la concentración de sustrato no alteran la velocidad hidrolítica, al menos dentro de un amplio rango de concentraciones. Esto quiere decir que no se produce inhibición por altas concentraciones de sustrato, lo que es general en ATPasas de otros sistemas biológicos. Sólo la ATPasa mitocondrial parece presentar la excepción a este comportamiento (176).

Un caso muy distinto es el que ocurre cuando a partir de la concentración óptima de sustrato, incrementamos sistemáticamente uno de los componentes del sustrato total, dejando el otro inalterado. Entonces el exceso de Mg^{2+} o de ATP libres se convierte en inhibidor de la actividad hidrolítica, tanto más cuanto mayor sea su concentración en exceso.

Desconocemos la razón exacta de estos hechos pero podemos aventurar algunas posibilidades de explicación.

Supongamos que el ATP y el Mg^{2+} forman complejos que sólo en condiciones bien definidas pueden unirse al centro activo y resolverse en producto finales de reacción. Al aumentar la concentración de Mg^{2+} indiscriminadamente, éste puede complejarse con el ATP en tales proporciones que o bien el complejo es incapaz de fijarse al centro activo, o siendo capaz de fijarse está desprovisto de eficiencia catalítica. Cualquiera de las posibilidades nos presentaría el efecto aparente de una disminución real de sustrato; pero creemos que ambas tienen muy poca posibilidad de dar cuenta de los hechos reales.

Más sugestiva y con mejores bases experimentales es la interpretación que se basa en que el Mg^{2+} se fija a la ATPasa en sitios distintos del centro activo; y quizás también en el centro activo en forma de un efector isostérico, pero sin que esta última fijación masiva e incontrolada, superior a la requerida para la óptima hidrólisis del ATP que dificultaría de alguna manera la solubilización enzimática de la ATPasa. La existencia de sitios para el Mg^{2+} distintos del centro catalítico y responsables de la aparente cooperatividad en la hidrólisis del ATP para ciertas curvas de saturación de sustrato, parece bastante aceptable. Si además tenemos en cuenta que el Mg^{2+} confiere a la ATPasa mayor sensibilidad a la digestión tripsica, lo que debe suponer algún cambio en su conformación, esta segunda interpretación adquiere mayor probabilidad. Tales condiciones hacen difícil suponer que el verdadero sustrato de la ATPasa sea el complejo Mg -ATP, puesto que en tal caso la eficiencia enzimática sería mayor cuantos más com-

plejos Mg-ATP llegaran al centro activo y ésto se lograría en una situación de equimolaridad.

La interpretación del efecto inhibitor del ATP libre no resulta nada fácil. Ishida y col. (166) y Ulrich (176) sugirieron que el ATP libre en exceso actuaba como un inhibidor competitivo. El ATP no complejo con el catión sería capaz de fijarse al centro activo de la enzima aunque no podría hidrolizarse, compitiendo de este modo con el sustrato. Esta posibilidad es válida sólo en el supuesto de que el verdadero sustrato sea el complejo Mg-ATP, pero no lo es si este supuesto no se cumple.

Nosotros creemos más probable que el ATP libre inhiba por un mecanismo semejante al que ocasiona las inhibiciones por altas concentraciones de sustrato. Supongamos que el Mg^{2+} tiene sus sitios específicos de fijación y el ATP los suyos. Admitamos también que el ATP se fija a su sitio propio por más de un resto de especificidad. De hecho, mecanismos de reacción para ATPasas dependientes de Na^+ y K^+ (177) sugieren varios puntos de unión entre la enzima y el ATP. Siendo esto cierto, el mecanismo de inhibición resulta fácil. Concentraciones de ATP inferiores o iguales a la concentración óptima se unirían a la enzima a través de todos sus puntos de unión, lo que determinaría una hidrólisis normal del ATP. Nuevas cantidades de ATP provocarían más y más acúmulo de moléculas en las proximidades del centro activo. Algunas podrían fijarse a él mediante todos

los restos de especificidad. Su fijación sería normal y su hidrólisis posible. Otras sólo se unirían al centro activo a través de alguno de los puntos de unión, lo que imposibilitaría su hidrólisis. De esta forma a mayor concentración de ATP mayor número de moléculas se fijarían incompletamente, y en consecuencia descendería la actividad hidrolítica de la ATPasa.

Si esta interpretación es cierta cabe preguntarse por qué altas concentraciones de $Mg^{2+}/ATP = 0.5$ no llegan a ser inhibitoras. Una posibilidad, basada en la independencia de sitios de unión para Mg^{2+} y ATP, podría encontrarse en la suposición de que sólo el Mg^{2+} libre pudiera unirse a su sitio o sitios y que sólo el ATP libre pudiera fijarse al centro catalítico. A elevadas concentraciones de ambos, prevalecería en el medio de reacción la forma complejo Mg-ATP, que no sería utilizable por la enzima, ni se uniría a ella; sólo el Mg^{2+} y el ATP disociados del complejo constituirían los elementos disponibles para la acción enzimática.

Puede que ninguna de estas posibilidades sea cierta; nosotros creemos que dan cuenta de los hechos experimentales y por esta razón los presentamos sólo como posibilidades o hipótesis de trabajo.

La cinética de saturación de sustrato, comprendiendo bajo esta denominación el Mg^{2+} y el ATP en una relación igual a 0.5, fué estudiada en la ATPasa unida a la membrana y en la enzima solubilizada con EDTA 3 mM tamponada con Tris pH 9. Los resultados no

aportan ningún dato en cuanto a la acción de la tripsina, si exceptuamos la identidad de K_{ms} y la diferencia de V_{ms} . En efecto, la tripsina no parece alterar la afinidad de la enzima por el sustrato en ninguno de los casos, pero en cambio incrementa mucho la velocidad máxima.

Lo verdaderamente nuevo es la diversidad de comportamiento seguido por la enzima ligada a la membrana y la forma soluble. La ATPasa asociada a la membrana bacteriana sigue cinética aparentemente de Michaelis. No podemos olvidar, sin embargo, que la representación de Hofstee puede dar lugar a otra interpretación. Una cooperatividad negativa entre distintos sitios o una heterogeneidad de sitios independientes es una solución completamente admisible. Esta última afirmación puede considerarse corroborada por el hecho de que la cinética de fijación de ATP a la enzima ligada sigue un modelo semejante. A pesar de eso no debemos forzar nuestras conclusiones, puesto que los resultados de fijación y de hidrólisis no son necesariamente comparables. Hay que tener en cuenta que la fijación es independiente de Mg^{2+} y representa el primer paso de un complicado mecanismo de reacción.

La ATPasa soluble presenta todos los indicios de una cooperatividad positiva para el sustrato ($Mg^{2+}/ATP = 0.5$), al menos a bajas concentraciones, ya que a concentraciones más altas esta cooperatividad desaparece o se vuelve negativa. La interpretación de estos queda ampliamente expuesta en Resultados.

El significado que pueden tener estos modelos para el micro organismo entra dentro del campo puramente especulativo. Se admite que el efecto esencial de una cooperatividad positiva es hacer la enzima más sensible a los cambios ambientales. Cada molécula de ligando que se une facilita la unión de las siguientes, con lo que la enzima se hace más y más sensible al ligando o ligandos. En contraposición la cooperatividad negativa protege y aísla la enzima contra las fluctuaciones metabólicas. La unión de cada molécula dificulta la unión de la siguiente, de manera que la enzima responde con dificultad a pequeñas variaciones de metabolitos. Una mezcla de estos dos tipos de cooperatividad positiva y negativa tiene también sentido, aun dentro de la misma enzima. Indicaría un aumento de sensibilidad a bajas concentraciones del ligando, en tanto que a rangos mayores de concentración esa sensibilidad estaría muy disminuida y se alteraría poco con pequeñas fluctuaciones de ligando. Desde el punto de vista fisiológico, qué pueden representar estas posibilidades de regulación y control enzimático?.

La asociación de la ATPasa con la membrana presupone que la enzima se halla localizada en su sitio específico, rodeada por su entorno natural y afectada por interacciones de los componentes de la membrana. Es verdad que el citoplasma ha sido eliminado y las membranas lavadas; con ello las interacciones de la ATPasa con los componentes citoplásmicos han desaparecido. Esto indudablemente no nos permite asegurar que las condiciones funcionales en que se halla ahora la enzima sean las mismas que las que poseía in vivo, sin embargo son una buena aproximación teniendo en cuenta la suavidad de

los tratamientos a que ha sido sometida la bacteria.

Por el contrario la ATPasa soluble está privada de su medio natural y sometida a las interacciones de las sustancias que la solubilizan. De un ambiente cuya estructura tiene las características de un estado sólido, ha pasado a un medio líquido, disgregante, con propiedades netamente distintas de las que la envolvían en la membranas.

Todos estos factores diversificantes pueden no cambiar en absoluto el comportamiento cinético de una enzima, pero también pueden alterarlo extraordinariamente, lo que significaría la enorme capacidad de múltiples interacciones entre las subunidades de la enzima. Esta capacidad representa una importancia vital como medio de respuesta de los sistemas vivos a las circunstancias ambientales.

Es posible que la cinética de la ATPasa ligada a la membrana, que nosotros hemos encontrado, responda fielmente al hecho real, tal como acontece en el microorganismo vivo. Si la cooperatividad negativa llegara a comprobarse, la enzima dispondría de un medio que le permitiría mantenerse al margen de pequeñas oscilaciones en la concentración de sustrato, autorregulando de este modo su actividad.

Al margen de que esta última consideración sea cierta o no, de lo que no cabe duda es de que la ATPasa dispone de una gran capacidad para efectuar interacciones cooperativas. El comportamiento cinético de la enzima soluble, puede ser totalmente irreal,

efecto del estado físico en que se encuentra la proteína y no extrapolable en absoluto a otras condiciones y mucho menos a la actividad de la enzima in situ, pero demuestra con claridad su potencial de cooperatividad.

Teniendo en cuenta que la ATPasa es una enzima polifuncional, los resultados de cinética nos inducen a sugerir que, la capacidad de interaccionar de las subunidades de la enzima, no utilizada claramente en la función hidrolítica del ATP, pudiera ser de gran importancia en otras funciones de la misma enzima. Esto parece lógico si pensamos que, lo contrario implicaría en la ATPasa la posesión de unas posibilidades funcionales no utilizadas en condiciones fisiológicas. Sin embargo también cabe pensar que determinadas circunstancias ambientales podrían imponer un cambio en el comportamiento cinético de la ATPasa, en cuyo caso su capacidad de interacciones cooperativas representaría la capacidad de respuesta del organismo a ciertas alteraciones del medio circundante.

La cinética de saturación de ATP a concentración de Mg^{2+} constante, y de Mg^{2+} a concentración de ATP constante, nos proporcionó nuevas aportaciones sobre el comportamiento de la ATPasa. Sin distinción entre el estado soluble y el ligado a la membrana, la enzima presenta dos sitios activos o dos grupos de sitios con afinidades netamente distintas para el ATP, uno a bajas concentraciones de ATP y otro a concentraciones más elevadas. La afinidad del primer grupo, expresada como K_m , es de 20 a 30 veces superior a la obtenida a

altas concentraciones de ATP.

La saturación de Mg^{2+} es todavía más ilustrativa. La ATPasa ligada a la membrana presenta cinética michaeliana, pero la afinidad de la enzima por el catión disminuye cuando la reacción se efectúa en presencia de tripsina. Este mismo efecto de la tripsina se repite con enzima al estado soluble, añadiendo además un modelo cinético claramente cooperativo.

Estos datos experimentales nos permiten sugerir algunas consideraciones. El Mg^{2+} y el ATP, que hasta ahora hemos englobado bajo la denominación de sustrato, son ambos absolutamente imprescindibles para la actividad enzimática, sin embargo su comportamiento cinético obedece a modelos muy diferentes. El ATP tiene dos sitios con afinidades distintas y muestra cinética michaeliana en todos los casos. El Mg^{2+} no ofrece diversidad de afinidades como el ATP, pero su afinidad se afecta por la presencia de tripsina y da lugar a fenómenos cooperativos con la enzima soluble. Esto parece descartar la probabilidad de que el verdadero sustrato sea el complejo Mg-ATP, en condiciones equimolares. Sin embargo, no podemos negar, en principio, que el catión ocupe un sitio en el centro catalítico de la enzima. Ahora bien, su eficacia como efector isostérico explicaría perfectamente los requerimientos que la ATPasa tiene de este metal, al mismo tiempo que estaría más en consonancia con los datos experimentales, los cuales demuestran que la actividad enzimática necesita menor concentración de Mg^{2+} que de ATP.

Por otra parte parece que el Mg^{2+} se fija, al menos, a un sitio de centro activo. Este sitio sería el afectado por la tripsina y su destrucción se traduciría en un descenso de la actividad del magnesio, pero este posible mecanismo ya queda excluido.

Otro aspecto de interés es que los fenómenos cooperativos comentado al hablar de la saturación de "sustrato" parecen depender exclusivamente a la presencia del catión y no a la del sustrato. En cualquier caso las condiciones ambientales de la ATPasa pueden ser la causa de que estos fenómenos se manifiesten ya sea de forma exclusiva o de forma cooperativa de este estado de la enzima.

En conclusión, pensamos que el Mg^{2+} tiene al menos dos sitios de fijación, una en el centro catalítico o tan próximo a él como para dar lugar a interacciones directas con el centro activo y otra en un componente o subunidad que actúa como inhibidor de la actividad catalítica y que es sensible a la acción de la tripsina. Es probable que este segundo sitio sea el responsable de los efectos cooperativos que la unión al sitio catalítico presente propiedades similares a las de un cofactor.

Aparte de estas sugerencias basadas en resultados conocidos, el mecanismo de reacción de la ATPasa es completamente desconocido. Existen ATPasas independientes de Na^+ y K^+ o de retículo sarcoplásmico. Se presentan la facilidad de aislar intermediarios fosforilados y determinar los grupos implicados en la fijación del ATP.

Robinson (177) ha propuesto un modelo de mecanismo de reacción para ATPasas dependientes de Na^+ y K^+ . El modelo incluye la participación del glutámico, serina e histidina en todo el mecanismo que se puede resumir así: El ATP fosforila la enzima formando glutamil fosfato en presencia de Na^+ y K^+ . La reacción se detiene en este paso cuando no hay K^+ disponible. La presencia de K^+ da lugar a una migración intramolecular del P_i desde el glutámico a la serina; la labilidad de la fosfoserina a pH neutro origina una hidrólisis inmediata. La histidina parece estabilizar el glutamil fosfato formando enlaces de hidrógeno. En consecuencia la fosforilación de la enzima es un proceso independiente del K^+ , pero la desfosforilación no ocurre sino bajo la acción de este catión. Este mecanismo es aceptado, en general, en el transporte de Na^+ y K^+ (225, 202). Sin embargo, recientemente Peter y col. (226) han afirmado que el primer paso de la reacción consistió en la fijación de 1 K^+ por centro activo, seguido de 2 Na^+ o el complejo Mg-ATP indistintamente. Solo el complejo formado por 1 K^+ , 2 Na^+ , Mg-ATP y enzima sería capaz de descomponerse para formar el intermediario fosforilado.

De otras ATPasas es muy poco lo que se sabe. Senior (227) ha encontrado que la ATPasa mitocondrial tiene residuos de tirosina implicados en la fijación y en la hidrólisis del ATP. Los esfuerzos para aislar intermediarios fosforilados en ATPasas bacterianas han sido hasta el presente infructuosos. Nosotros lo hemos intentado reiteradamente pero con suerte paralela. La extraordinaria velocidad

de la reacción y la falta de un inhibidor no competitivo puro hacen imposible todo esfuerzo por aislar una fosfo-enzima que caso de existir debe tener una vida muy breve.

Hemos mencionado más arriba la diferencia de afinidades que la ATPasa tiene por el ATP a bajas concentraciones y a altas y que esta diferencia se manifiesta a concentraciones constantes de Mg^{2+} . La razón fisiológica no la conocemos pero cabe hacer alguna suposición. La concentración de Mg^{2+} en la célula bacteriana debe mantenerse constante dentro de pequeñas oscilaciones, ya que nuestros intentos por detectar una acumulación del catión dentro de la bacteria, cultivándola en medio con exceso de Cl_2Mg , han resultado infructuosos. En estas condiciones la ATPasa respondería a los cambios de pequeñas concentraciones de ATP (quizás las concentraciones normales que ocurren en el metabolismo celular) con una cinética Michaeliana y una gran afinidad por el ATP. Cuando cualquier causa anormal diera lugar a una concentración de ATP extraordinaria, la ATPasa autoregularía su actividad, eliminando el ATP en exceso mediante estos sitios activos de menor afinidad. El hecho de que tanto la enzima soluble como la ligada a la membrana presenten este efecto, aboga más eficazmente por implicarlo de alguna manera en el metabolismo celular de la bacteria.

Uno de los sistemas más biológicos de control de reacciones enzimáticas es el de inhibición por productos finales. Los seres vivos regulan de esta forma sus procesos metabólicos. La ATPasa de E. coli

entre otras posibles funciones lleva a cabo la de hidrolizar ATP, cuyos productos finales son ADP y Pi. En tubo de ensayo, tanto la enzima unida a la membrana como la soluble son inhibidas por estos dos productos finales. El tipo de inhibición responde a un mecanismo de inhibición competitiva pura para el ADP y probablemente también para el Pi. Las constantes de inhibición para el ADP son ligeramente inferiores a las Kms para el sustrato, lo que indica una mayor afinidad de la enzima por el inhibidor. Resultados semejantes pero mucho más drásticos fueron obtenidos por Philo y col. (228) con ATPasa soluble mitocondrial. La constante de disociación para el ADP era unas 50 veces inferior a la constante de Michaelis lo que implica una rápida inhibición por productos finales, traducible en la curvatura inmediata de la velocidad en función del tiempo. En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados muy parecidos con la ATPasa purificada de Micrococcus lysodeikticus.

La constante de inhibición para el Pi es del mismo orden que la Km o incluso ligeramente superior.

Como era de suponer el orden aparente de reacción para el inhibidor competitivo (ADP) aparece afectado por la concentración de sustrato. Según vamos aumentando la concentración de sustrato el orden aparente de reacción para el ADP disminuye, no dependiendo del estado de la enzima, ni de la presencia o ausencia de tripsina. Esto confirma la competitividad de ADP y sustrato por el mismo sitio, puesto que no existe otra razón inmediata que haga variar el orden de reacción.

Fenómeno semejante ocurre con el orden de reacción para el sustrato a concentraciones crecientes de ADP, cuando se estudia la ATPasa asociada a la membrana. A mayor concentración de ADP menor es el orden de reacción para el sustrato y viceversa. La enzima soluble presenta dos nuevos aspectos. En primer lugar, el descenso en el orden de reacción para el sustrato como función de la concentración de inhibidor, puede deberse a una competencia por el centro catalítico o bien a un debilitamiento de las interacciones entre las subunidades, causado por las cantidades crecientes de inhibidor. En segundo lugar, a concentraciones superiores de sustrato, el orden aparente de reacción no parece afectarse por la presencia de cantidades variables de inhibidor, lo que sugiere que la ATPasa presenta sitios de muy baja afinidad para el ADP o quizás nula que no obstante fijan e hidrolizan ATP.

El significado fisiológico de la inhibición por productos finales es harto conocido. Con ella el organismo tiende a limitar la acumulación de metabolitos que no le son necesarios en aquel momento. Existe sin embargo un aspecto de explicación no tan inmediata. La ATPasa soluble a altas concentraciones de sustrato parece disponer de sitios que no se afectan por el ADP. Indudablemente esto implica una nueva capacidad de la enzima no expresada en la forma ligada a la membrana. Puede ser que no tenga ningún significado fisiológico, y que no se produzca en ningunas condiciones de la vida del microorganismo, pero también puede tenerlo. Supongamos una situación de la bacteria en que la

cantidad de ATP es excesivamente elevada, por cualquier causa; entonces lo que podría interesarle era eliminar parte de ese ATP y una condición favorable para poder eliminarlo es que los productos finales (ADP) no limiten la velocidad de hidrólisis. Una vez que la cantidad de ATP hubiera descendido por debajo de ciertos niveles el ADP actuaría de inhibidor frenando la actividad enzimática. Esta sugerencia implica una posibilidad más de regulación de la actividad ATPásica, enzima compleja y multifuncional.

Diciclohexilcarbodiimida fué uno de los inhibidores probados por nosotros con la ATPasa de E.coli. Al igual que en otros sistemas bacterianos y el mismo E.coli (112, 196, 197) hemos comprobado su absoluta ineficacia como inhibidor de la enzima soluble mientras se presenta como un potente inhibidor de la ATPasa asociada a la membrana. Weiner y col. (229) han demostrado que no sólo es inhibidor de la ATPasa ligada a la membrana en E.coli sino también del transporte activo, pero su mecanismo de inhibición es todavía desconocido. Berger (230) y Simoni y col. (231) propusieron que el acoplamiento de la energía metabólica al transporte activo en bacterias, se efectuaba a través de la ATPasa. Rosen (198) utilizando un mutante de E.coli que carecía de actividad ATPásica y transporte activo, restauró parcialmente la capacidad de transporte en presencia de DCCD. Bragg y col. (232) en la misma línea de experiencias, pudieron restaurar la actividad transhidrogenásica de un mutante, por adición de DCCD. Esto le llevó a suponer que la ATPasa tenía un papel como

De estos resultados se pueden deducir dos cosas: 1.- La ATPasa tiene una función como proteína en el acoplamiento de energía al transporte activo que es independiente de su actividad enzimática, pudiendo separarse funcionalmente como se comprueba con mutantes (128). Mutante sin actividad ATPásica tiene transporte activo normal. 2.- El DCCD puede desempeñar, en parte, esa función de la ATPasa como proteína. Esta posibilidad ya había sido sugerida a propósito de la fosforilación oxidativa mitocondrial por Fessenden-Raden (233) quien afirmó que la proteína ATPasa juega también un papel estructural y que esa función puede ser reemplazada bajo condiciones apropiadas por inhibidores de la ATPasa tales como el DCCD.

Estas conclusiones nos dan mucha luz sobre la complejidad de la ATPasa, pero no nos dan una explicación definitiva del mecanismo inhibitor del DCCD. Harold y col. (196) propusieron que el DCCD se unía covalentemente a una proteína de la membrana que de alguna manera impedía la actividad enzimática de la ATPasa. Esto puede ser cierto, pero dados los conocimientos actuales sobre el efecto del DCCD en mutantes, parece lógico admitir una interacción más directa entre el inhibidor y la enzima. El hecho de que no se dé esta interacción en la ATPasa soluble puede atribuirse satisfactoriamente a la falta de algún componente de membrana con el cual acoplaba la ATPasa el DCCD.

En consecuencia creemos que el DCCD inhibe la ATPasa de membrana por un acoplamiento entre alguna o algunas funciones de la enzima con otras de componentes adyacentes, ^{lo} que lleva a una pérdida de actividad, mientras que la disposición de las funciones de la ATPasa

soluble no permite reacciones de acoplamiento, o si existen no perjudican la actividad enzimática.

La azida de sodio inhibe ambos estados de la ATPasa con efectividad similar al igual que sucede con otras ATPasas estudiadas. Su mecanismo se supone que es debido a la formación de radicales libres.

Inhibidores específicos de ATPasa mitocondrial como la oligomicina y de ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ como la ouabaina no tienen acción alguna sobre la ATPasa de E. coli.

Más extraño es todavía lo que acaece con la atebrina. Esta acridina activa la ATPasa de Micrococcus lysodeikticus a bajas concentraciones y la inhibe a concentraciones superiores (234). Sin embargo es completamente ineficaz con la ATPasa de E. coli en cualquiera de sus estados y dentro de un rango de concentraciones muy amplio.

Estas características manifestadas frente a ciertos inhibidores, confieren a la ATPasa de E. coli una peculiar individualidad, dentro del acervo de propiedades comunes con otras enzimas similares. Individualidad que le es proporcionada, no probablemente por las propiedades moleculares de la enzima, sino por el entorno que envuelva a la molécula y que en última instancia viene exigida por las necesidades funcionales de organismo.

La ATPasa de E. coli ha demostrado tener una estabilidad al calor diferente, según se trate de la enzima soluble o ligada a la membrana. Con una diferencia de 10 °C se desnaturaliza o al menos

se inactiva irreversiblemente antes la proteína soluble que la particulada. La causa no es bien conocida, pero puede deberse a proteólisis o más probablemente a la extrema labilidad de la misma enzima. Es harto conocida la inestabilidad de algunas ATPasas al frío (164, 167) entre ellas la de E.coli (146). Teniendo en cuenta esto, no sería nada extraño que la elevación de temperatura perjudicara la forma soluble al igual que acontece con las bajas temperaturas. La máxima estabilidad para este estado de la enzima lo hemos encontrado a 20 °C, lo que podría ser una confirmación de las afirmaciones precedentes.

La ATPasa asociada a la membrana tiene una representación de Arrhenius con una transición termotrópica a 18 °C. La soluble no presenta este fenómeno. De acuerdo con los modelos más probables de membrana (35, 36) las proteínas se encuentran embebidas en un medio lipídico interaccionando con él a través de enlaces iónicos e hidrofóbicos. Consecuencia inmediata de estas interacciones, que son las que mantienen la estructura de la membrana, es que los lípidos deben afectar de forma más o menos decisiva la estructura cuaternaria de las enzimas o al menos su distribución de cargas. Ahora bien los lípidos pueden encontrarse, dependiendo de la temperatura, en dos estados físicos diferentes. El punto de fusión depende de la naturaleza de los lípidos, pero el efecto de la fusión es el mismo. La estructura L/β' se caracteriza por una mayor desorganización y movilidad de las cadenas parafínicas como corresponde a todo estado de fusión; e indefectiblemente este cambio de estado debe traducirse en una alteración de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Las nuevas interacciones

lípidos-proteína condicionan una situación nueva para la proteína que si es enzimáticamente activa se expresan en un cambio de energía de activación. El estado sólido cristalino de los lípidos ocasiona una mayor energía de activación para las enzimas relacionadas con ellos, energía que desciende normalmente al fundirse los lípidos.

Es importante hacer notar que no todos los lípidos juegan el mismo papel en los cambios de energía de activación. Charnock y col. (235) han encontrado que ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ de microsomas presenta una transición que desaparece al tratar los microsomos con fosfolipasa A, pero que recupera totalmente al añadir fosfatidilserina a los microsomas tratados con fosfolipasa A. Tanaka y col. (236) con ATPasas dependientes de Na^+ y K^+ de distintos orígenes comprobaron que, era la naturaleza del medio lipídico que envolvía a la enzima, la determinante de los cambios de energía de activación, no la distinta procedencia de la enzima.

Estos resultados confirman que los cambios de energía de activación que ocurren en las transiciones de fase de los lípidos son debidos a un reordenamiento de interacciones entre la enzima y los lípidos relacionados con ella.

La ausencia de cambio de pendiente en la ATPasa soluble es debida a la falta de lípidos, o bien a que los que acompañan a la enzima no alteran de manera significativa sus interacciones con la ATPasa al experimentar la transición de fase.

La fijación de ATP a la ATPasa en sus dos estados dió lugar a resultados completamente acordes con la cinética de saturación de sustrato para velocidades iniciales. La enzima unida a la membrana presenta dos sitios con distintas afinidades, aunque no puede descartarse la existencia de cooperatividad negativa. La fracción soluble responde al incremento de concentraciones de ATP mostrando efectos homotrópicos positivos; comportamiento idéntico al de cinética. Sin embargo, hay que notar algunas diferencias: 1º. La cinética de fijación de ATP es independiente de la presencia de Mg^{2+} . Esto parece indicar que el catión es necesario en un paso posterior del mecanismo de reacción enzimática, no precisamente en el de formación del complejo enzima-ATP; lo que no estaría de acuerdo con la necesidad de Mg^{2+} para el primer paso de la reacción de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , como ya indicamos.

2º. La cinética de fijación de ATP a la ATPasa soluble presenta cooperatividad positiva, mientras la saturación de ATP a Mg^{2+} constante, determinado por velocidades iniciales da una respuesta distinta. Ambos resultados no son contradictorios; sólo indicarían la complejidad de la reacción. La actividad hidrolítica es absolutamente dependiente del Mg^{2+} y por consiguiente su modelo de cinética no tiene por qué coincidir con el de fijación de ATP. Sin embargo ha sido un resultado inesperado.

3º. Las constantes de disociación del ATP son mucho más pequeñas que las K_m s. Esto es completamente lógico si tenemos en cuenta la gran velocidad de reacción de la ATPasa de *E. coli*, pero están de acuerdo con valores hallados en otros sistemas

Con los datos de fijación creemos haber completado una visión necesariamente parcial, pero también bastante sugestiva de la compleja función enzimática de la ATPasa de E.coli.

CONCLUSIONES

- 1º.- La ATPasa de E.coli puede ser solubilizada mediante EDTA en condiciones alcalinas, de forma específica y casi total.
- 2º.- La actividad enzimática total de la fracción soluble es superior a la de la enzima asociada a la membrana.
- 3º.- La ATPasa unida a la membrana y la soluble son estimulables por tripsina. Dependiendo de diversas condiciones el grado de estimulación varía entre límites muy amplios.
- 4º.- La tripsina estimula la actividad ATPásica, posiblemente destruyendo una parte de la molécula enzimática que posee condiciones específicas de fijación para el Mg^{2+} .
- 5º.- La ATPasa soluble es muy inestable debido a la disociación en subunidades. Su labilidad se extrema cuando se la mantiene a bajas temperaturas.
- 6º.- El peso molecular de la enzima se aproxima a 300.000 daltones.
- 7º.- La cinética de saturación de sustrato es Michaeliana para la enzima asociada a la membrana y sigmoide para la fracción soluble.
- 8º.- La ATPasa en cualquiera de los estados en que ha sido estudiada presenta al menos dos sitios con afinidades distintas para el ATP.
- 9º.- El Mg^{2+} parece fijarse específicamente a sitios distintos del centro activo, y es el responsable del comportamiento cooperativo de la enzima en su estado soluble.

109.- Creemos que el complejo Mg-ATP no es el verdadero sustrato de la reacción.

119.- Los productos finales de la reacción son inhibidores competitivos de la actividad enzimática.

129.- El DCCD inhibe la ATPasa asociada a la membrana pero no la solubilizada.

139.- La ATPasa asociada a la membrana presenta dos energías de activación distintas, con el punto de discontinuidad a los 18 °C.

La ATPasa soluble tiene solo una energía de activación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Nageli, C. and Cramer, C. (1855) Pflanzenphysiologische Untersuchungen. 1 Heft. Zurich: F.Schultees.
- 2.- Pfeffer, W. (1897) Osmotische Untersuchungen. Leipzig: Engelmann.
- 3.- Overton, E. (1899) Vischr. Naturf. Ges. Zurich, 44, 88.
- 4.- Chambers, R. (1924) In Cowdry, General Cytology. University of Chicago Press.
- 5.- Plowe, J.A. (1931) Protoplasma, 12, 196.
- 6.- Gorter, E. and Grendel, F. (1925) J. Exp. Med. 41, 439.
- 7.- Harvey, E.N. (1931) Biol.Bull. 61, 273.
- 8.- Danielli, J.F, and Davson, H. (1935) I.cell.comp. Physiol.5, 495.
- 9.- Stein, W.D. and Danielli, J.F. (1956) Disc.Faraday Soc.21, 238.
- 10.- Davson, H. (1962) Circulation, 26, 1022.
- 11.- Robertson, J.D, (1959) Biochem.Symp. N^o 16. p.3
- 12.- Sjöstrand, F.S. (1968) In the Membranes, p.151. Ed. by Dalton, A.J. and Haguenan, F. New York and London. Academic Press.
- 13.- Fernández-Morán, H. (1962) In The Interpretation of Ultrastructure, p.411. Ed. by Harris, R. New York and London. Academic Press.
- 14.- Lucy, J.A. (1964) J. Theor.Biol. 7, 360.
- 15.- Green, D.E. and Perdue, J.F. (1966) Ann.N.Y. Acad.Sci.137, 667.
- 16.- Chapman, D., Kamat, V.B., de Gier, J. and Peukett, S.A.(1966) Nature, 213, 74.
- 17.- Lenard, I. and Singer, S.J. (1966).Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 56, 1828.
- 18.- Branton, D. (1969) A.Rev. Pl. Physiol. 20, 209.

- 19.- Wilkins, M.H.F., Blanrock, A.E. and Engleman, D.M. (1971)
Nature, 230, 71
- 20.- Finean, J.B., Bramley, T.A. and Coleman, R. (1971) Nature
229, 114.
- 21.- Bretscher, M.S. (1971) J.Mol.Biol. 59, 351.
- 22.- Reinert, J.C. and Stein, J.M. (1970) Science, 168, 1580.
- 23.- Engelman, D.M. (1971) J.Mol.Biol. 58, 153
- 24.- Wilson, G., Rose, S.P. and Fox, C.F. (1970) Biochem.Biophys.
Res.Comm. 38, 617.
- 25.- Overath, P. and Träuble, H. (1973) Biochemistry, 12, 2625.
- 26.- Blazyk, J.F. and Stein, J.M. (1972) Biochim.Biophys.Acta, 266, 73
- 27.- Eletr., J., and Inesi, G. (1972) Biochim.Biophys.Acta, 290, 178.
- 28.- McClure, D.W. (1968) J.Chem.Phys. 49, 1830
- 29.- Melchoir, D.L., Morowitz, H.J., Sturtevant, J.M. and Tsong, T.Y.
Biochim.Biophys.Acta, 219, 114.
- 30.- Tourtellotte, M.E., Branton, D., Keith, A. (1970) Proc.Nat.Acad.
Sci. USA, 66, 909.
- 31.- Metcalfe, J.C., Birdsall, N.J.M. and Lee, A.G. (1972) FEBS
Letters, 21, 335.
- 32.- McConnell, H.M., Wright, K.L. and McFarland, B.G. (1972) Bioche
Biophys.Res.Comm. 47, 273.
- 33.- Träuble, H. and Overath, P. (1973) Biochim.Biophys.Acta, 307, 491.
- 34.- Singer, S.J. (1971) in Structure and Function of Biological Mem-
branes, L.I.Rothfield, Ed. Academic Press. New York, p.145.
- 35.- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) Science, 171, 720.
- 36.- Green, D.E., Ji, S. and Brucker, R.F. (1973) Bioenergetics 4, 253

- 37.- Benson, A.A. (1968) In Membrane Models and the Formation of Biological Membranes. Ed. by Bolis, L. and Pethica, B.A. Amsterdam, North Holland.
- 38.- Green, D.E. and Perdue, J.F. (1966) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 55, 1295.
- 39.- Vanderkooi, G. and Green, D.E. (1970) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 615.
- 40.- Lenard, I. and Singer, S.J. (1966) Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 56, 1828.
- 41.- Glaser, M., Simpkins, H., Singer, S.J., Shecta, M., Chen, S.I. (1970) Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 65, 721.
- 42.- Green, D.E. (1972) Ann.N.Y.Acad.Sci. 195, 150.
- 43.- Glaser, M. and Singer, S.J. (1971) Biochemistry, 10, 1780.
- 44.- Fleischer, S., Brierleg, G., Klouwen, H. and Slautterback, D.B. (1962) J.Biol.Chem. 237, 3264.
- 45.- Tiggie, D. (1970) Recent.Progr.Surface,Sci. 3, 273,
- 46.- Schairer, H.U., and Overath, P. (1969) J.Mol.Biol. 44, 209.
- 47.- Monod, J., Wyman, J. and Changeus, J-P., (1965) J.Mol.Biol. 12, 88
- 48.- Birch-Andersen, A., Maale, O. and Sjöstrand, F.S. (1953) Biochim. Biophys.Acta, 12, 395.
- 49.- Kellenberger, E. and Ryter, A. (1958) J.Biophys.Biochem.Cytol. 4, 323.
- 50.- Salton, M.R.J. (1964) The Bacterial Cell Wall, XIII, p.293, Elsevier, Amsterdam.
- 51.- Salton, M.R.J. (1971) In Biomembranes, vol.I Ed. Manson, L.A. Plenum Press. New York.
- 52.- Braun, V. and Schwartz, U. (1969) J.Gen.Microbiol. 57, iii.

- 53.- Braun, V. and Wolff, H. (1970) *Eur.J.Biochem.* 14, 387
- 54.- Forsberg, C.W., Costerton, J.W. and MacLeod, R.A. (1970)
J.Bacteriol. 104, 1338.
- 55.- Forsberg, C.W., Costerton, J.W. and MacLeod, R.A. (1970)
J.Bacteriol. 104, 1354.
- 56.- Miura, T. and Mizushima, S. (1968) *Biochim.Biophys.Acta*, 150, 159.
- 57.- Schnaitman, C.A. (1970) *J.Bacteriol.* 104, 882.
- 58.- Shapiro, B.M., Siccardi, A.G., Hirota, Y. and Jacob, F. (1970)
J.Mol.Biol. 52, 75.
- 59.- Siccardi, A.G., Shapiro, B.M., Hirota, Y. and Jacob, F. (1971)
J.Mol.Biol. 56, 475.
- 60.- Inouye, M. and Yee, M-L (1973) *J.Bacteriol.* 113, 304
- 61.- Schnaitman, C.A. (1970) *J.Bacteriol.*, 104, 890.
- 62.- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J. (1972)
J.Biol.Chem., 247, 8962.
- 63.- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J. (1972)
J.Biol.Chem., 247, 3972.
- 64.- Sekizawa, J. and Fukui, S. (1973) *Biochim.Biophys.Acta*, 307, 104
- 65.- Schnaitman, C.A. (1971) *J.Bacteriol.*, 108, 553.
- 66.- Weidel, W. and Peltzer, H. (1964) *Advan.Enzymol.* 26, 193.
- 67.- Strominger, J.L., Izaki, K., Matsushashi, M. and Tipper, D.J.
(1967) *Fed.Proc.* 26, 9.
- 68.- Leive, L. (1965) *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 21, 290.
- 69.- Muschel, L.H., and Gustafson, L. (1968) *J.Bacteriol.* 95, 2010.
- 70.- Leive, L., Shovlin, V.K. and Mergenhagen, S.E. (1968) *J.Biol.
Chem.*, 243, 6384.

- 71.- Mitchell, P. (1961) In *Biological Structure and Function*. Goodwin, T.W. and Linberg, G., Eds. Vol.2, p.581, Academic Press, New Y
- 72.- Malamy, M. and Horecker, B.L. (1961) *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 5, 104.
- 73.- Neu, H.C. (1969) *J.Gen.Microbiol.* 57, 215.
- 74.- Nisonson, I., Tannenbaun, M. and Neu, H.C. (1969) *J.Bacteriol.* 93, 1360.
- 75.- Wetzel, B.K., Spicer, S.S., Dvorak, H.F. and Heppel, L.A. (1971) *J.Bacteriol.* 104, 529.
- 76.- Brockman, R.W. and Heppel, L.A. (1968) *Biochemistry*, 7, 2554.
- 77.- Pardee, A.B. and Watanabe, K. (1968) *J.Bacteriol.* 96, 1049)
- 78.- Penrose, W.R., Nichoalds, G.E., Piperno, J.R. and Oxender, D.L. (1968) *J.Biol.Chem.*, 243, 5921.
- 79.- Anraku, Y. (1968) *J.Biol.Chem.*, 243, 3128.
- 80.- Cashel, M. and Freese, E. (1964) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 16, 541.
- 81.- Birnboim, H.C. (1966) *J.Bacteriol.* 91, 1004.
- 82.- De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) *Ann.Rev.Physiol.* 28, 435.
- 83.- Heppel, L.A. (1971) In *Structure and Function of Biological Membranes*. Ed. L.I.Rothfield, p.243. Academic Press. New York.
- 84.- Glaser, M.L., Melo, A. and Paul, R.J. (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 1944.
- 85.- Chapman, G.B. and Hillier, J. (1953) *J.Bacteriol.* 66, 362.
- 86.- Ryter, A. and Kellenberger, E. (1958) *Z.Naturforsch.* 136, 597.
- 87.- Fitz-James, P.C. (1960) *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 8, 507.
- 88.- Ryter, A. and Jacob, F. (1966) *Ann.Inst.Pasteur*, 110, 801.
- 89.- Pontefract, R.D., Bergeron, G. and Thatcher, F.S. (1969) *J.Bacteriol.* 97, 367

- 90.- Ryter, A. (1968) *Bacteriol. Rev.*, 32, 39
- 91.- Ghosh, B.K., Lampen, J.O. and Remsen, C.C. (1969) *J. Bacteriol.* 100, 1002.
- 92.- Highton, P.J. (1969) *J. Ultrastruct. Res.* 26, 130.
- 93.- Giesbrecht, P. and Ruska, H., (1968) *Klin. Wochenschr.* 46, 575.
- 94.- Neuhaus, F.C. (1968) *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 1967, 304.
- 95.- Higgins, M.L. and Shockman, G.D. (1971) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1, 29.
- 96.- Owen, P. and Freer, J.H. (1972) *Biochem. J.*, 129, 907.
- 97.- Rogers, H.J. (1970) *Bacteriol. Rev.* 34, 194.
- 98.- Reavely, D.A. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 649.
- 99.- Patch, C.T. and Landman, O.E. (1971) *J. Bacteriol.* 107, 348.
- 100.- Thorne, K.J.I. and Barker, D.C. (1972) *J. Gen. Microbiol.* 70, 87.
- 101.- Ellar, D.J., Thomas, T.D. and Postgate, J.A. (1971) *Biochem. J.* 122, 44P.
- 102.- Reusch, V.M., Jr. and Burger, M.M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*
- 103.- Gel'man, N.S., Tikhonova, G.V., Simakova, I.M., Lukyanova, M.A., Tapykova, S.D. and Mikelsaar, H.M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 223, 321.
- 104.- Reusch, V.M., Jr. and Burger, M.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 79.
- 105.- Jacob, F., Brenner, J. and Cuzin, F. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 329.
- 106.- Fitz-James, P.C. (1967) *Protides Biol. Fluids* 15, 289.
- 107.- Repaske, R. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 225.
- 108.- Grag, G.W. and Thurman, P.F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 947

- 109.- Braun, V. and Wolf, H. (1970) *Eur.J.Biochem.* 14, 387
- 110.- DePamphilis, M.I. (1971) *J.Bacteriol.* 105, 1184
- 111.- Kobayashi, H. and Anraku, Y. (1972) *J.Biochem.*, 71, 387
- 112.- Roisin, M-P. and Kepes, A. (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 275, 333
- 113.- Lederberg, J. (1956) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 42, 574.
- 114.- Kaback, H.R. (1971) W.B.Jakoby, *Methods in Enzimology*. Vol.22 Academic Press. New York p.99.
- 115.- Kaback, H.R. (1970) In Kleinzeller, A. and Bronner, F., *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol.1 p.35. Academic Press New York.
- 116.- Kaback, H.R. (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 265, 367.
- 117.- Evans, D.J. (1969) *J.Bacteriol.* 100, 914.
- 118.- Davies, P.L. and Bragg, P.D. (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 266, 273.
- 119.- Fitz-James, P.C. (1968) in *Microbial Protoplasts Spheroplasts and L.Forms* (Guze, L.B., eds.) p.124 Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- 120.- Ferrandes, B., Frehes, C. and Chaix, P. (1970) *Biochim.Biophys Acta*, 223, 292.
- 121.- Schnaitman, J.C. (1971) *J.Bacteriol.* 108, 545.
- 122.- Steck, T.L. and Fox, C.F. (1972) In *Membrane Molecular Biology* Ed. by Fox, E.C. and Keith, A.D. p.27, Sinauer Associates Inc. Publishers. Stamford, Conn.
- 123.- Hill, T.L. (1967) *Proc.Nat.Acad.Sci.* 58, 111.
- 124.- Hecht, S., Shlaer, S. and Pirene, M.H. (1942) *J.Gen.Physiol.* 25, 819.
- 125.- Williams, C.H., Vail, W.J., Harris, R.A., Caldwell, M., Green, D.E. and Valdivia, E. (1970) *Bioenergetics*, 1, 147.

- 126.- Nachmansohn, D., (1968) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 61. 1034.
- 127.- Sonenberg, M. (1971) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 68, 1051.
- 128.- Nomura, M. (1964) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 52, 1514.
- 129.- Cramer, W.A. and Phillips, S.K. (1970) *J.Bacteriol.* 104, 819.
- 130.- Changeux, J.P., Thiery, J., Tung, Y. and Kittel, C. (1967)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 57, 335
- 131.- Wallach, D.F.H. (1971) In *The Dynamic Structure of Cell Membranes*. Ed. by Wallach, D.F.H. and Fischer, H. p.181. Springer-Verlag, Berlin.
- 132.- Monod, J., Changeux, J-P. and Jacob, F. (1963)*J.Mol.Biol.* 6, 306
- 133.- Changeux, J-P, Podleski, T. (1968) *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 59, 9'
- 134.- Changeux, J-P, and Thiery, J. (1968) In *Regulatory functions of biological membranes*. Ed. by Järnefelt, J. B.B.A. Library 11, pag. 115. Amsterdam:Elsevier.
- 135.- Blumenthal, R., Changeux, J-P, Lefever, R. (1970) *J.Membrane Biol.* 2, 351.
- 136.- Koshland, D.E. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Anant. Biol.* 28, 473.
- 137.- Vambutas, V.K. and Racker, E. (1965) *J.Biol.Chem.*, 240, 2660.
- 138.- Muñoz, E., Salton, M.R.J., Ng, M.H. and Schor, M.T. (1969)
Eur.J.Biochem, 7, 490.
- 139.- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J.Biol.Chem.*, 193, 265.
- 140.- Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H. (1971)
Biochemistry, 10, 2606.
- 141.- Weinbaum, G. and Markman, R. (1966) *Biochim.Biophys.Acta*, 124, 20
- 142.- Fischer, L. (1971) In *An Introduction to gel chromatography*. Ed.

- 143.- Muñoz, E., Salton, M.R.J. and Ellar, D.J. (1970) FEBS symposium, 20, 51.
- 144.- Saurge, N. (1957) Biochem.J., 67, 146.
- 145.- Nachbar, M.S., Salton, M.R.J. (1970) Surface Chemistry of Biological Systems, Plenum Press 175.
- 146.- Evans, D.J. (1970) J.Bacteriol. 104, 1203.
- 147.- Bray, G.A. (1960) Anal.Biochem., 1, 279.
- 148.- Benard-Bentaboulet, M. and Kepes, A. (1973) Biochim.Biophys. Acta, 197-211.
- 149.- Muñoz, E., Nachbar, M.S., Schor, M.T. and Salton, M.R.J. (1968) Biochem.Biophys.Res.Comm., 32, 539.
- 150.- Racker, E. (1962) Fed.Proc. 21, 54.
- 151.- Kasbekar, D.K. and Durbin, R.P. (1965) Biochim.Biophys.Acta, 105, 472.
- 152.- Simon, B., Kinne, R. and Sachs, G. (1972) Biochim.Biophys.Acta 282, 293.
- 153.- Sachs, G., Shah, G., Strych, A., Oline, G. and Hirschowitz, B.I. (1972) Biochim.Biophys.Acta, 266, 625.
- 154.- Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) J.Biol.Chem. 238, 3762.
- 155.- Nelson, N., Nelson, H. and Racker, E. (1972) J.Biol.Chem, 247, 7657.
- 156.- Salton, M.R.J. and Schor, M.T. (1972) Biochem.Biophys.Res. Commun. 49, 350.
- 157.- Bond, G.H. (1972) Biochim.Biophys.Acta, 288, 423.
- 158.- Ornstein, L. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321.
- 159.- Davis, B.J. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404.
- 160.- Lastras, M., Muñoz, E. (1971) FEBS letters, 14, 69.

- 161.- Hurwitz and Schmid (1970) Bacteriol.Proc. abstract n^o p.46, p.130
- 162.- Racker, E. (1967) Fed. Proc. 26, 1335.
- 163.- Tzagoloff, A. (1969) J.Biol.Chem., 244, 5020.
- 164.- Catterall, W.A. and Pedersen, P.L. (1971) J.Biol.Chem. 246, 4987.
- 165.- Lieu, S., Berzborn, R.J. and Racker, E. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3520.
- 166.- Ishida, M. and Mizushima, S. (1969) J.Biochem. 66, 33.
- 167.- Mirsky, R. and Barlow, V. (1971) Biochim.Biophys.Acta, 241, 835.
- 168.- Abrams, A. (1965) J.Biol.Chem. 240, 3675.
- 169.- Determann, H. and Michel, W. (1966) J.Chromatography, 25, 303.
- 170.- Schnebli, H.P., Vatter, A.E. and Abrams, A. (1970) J.Biol.Chem. 245, 1122.
- 171.- Andreu, J.M., Albendea, J.A., Muñoz, E. (1973) Eur.J.Biochem. 37, 505.
- 172.- Mirsky, R., Barlow, V (1973) Biochim.Biophys.Acta, 291, 480.
- 173.- Dixon, M. and Webb, E. (1971) The Enzymes 2nd Ed. Longman
- 174.- Carvalho, A.P. and Leo, B. (1967) J.General Physiol. 50, 1324.
- 175.- Abrams, A., McNamara, P. and Johnson, F.B. (1960) J.Biol. Chem., 235, 3659.
- 176.- Ulrich, F. (1964) J.Biol.Chem. 239, 3532.
- 177.- Robinson, J. (1971) Nature, 233, 419.
- 178.- Lineweaver, H. and Burk, D (1934) J.Am.Chem.Soc. 56, 658.
- 179.- Hill, A.V. (1910) J.Physiol. 40, IV.
- 180.- Cook, R.A., Koshland, D.E. (1970) Biochemistry, 9, 3337.
- 181.- Scatchard, G. (1949) Ann.N.Y.Acad.Sci., 51, 660.

- 182.- Klotz, I.M., Walker, F.M. and Pivan, R.B. (1946) J.Am.Chem. Soc. 68, 1486.
- 183.- Hofstee, B.H.J. (1952) Science, N.Y. 116, 329
- 184.- Taketa, K. and Pogell, B.M. (1965) J.Biol.Chem. 240, 651.
- 185.- Hammes, G.G. and Hilborn, D.A. (1971) Biochim.Biophys.Acta 233, 580.
- 186.- Nelson, N., Nelson, H. and Racker, E. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6506.
- 187.- Dixon, M. (1953) Biochem.J. 55, 170.
- 188.- Baker, R.H., Jr. and Mahler, H.R. (1962) Biochemistry, 1, 35.
- 189.- Mahler, H.R. and Cordes, E.H. (1971) Biological Chemistry, Harper and Row, New York, 2nd ed.
- 190.- Changeux, J-P. (1963) Cold Spring Harbor Symposia Anant. Biol. 28, 497.
- 191.- Hollowag, C.I., Robertson, A.M., Knight, I.G. and Beechey, R.B. (1966) Biochem.J., 100, 79.
- 192.- Beechey, R.B., Kattele, K.J., Holloway, C.I., Knight, I.G. and Lindop, C.R. (1971) In Energy Transduction in Respiration and Photosynthesis. Ed. by Slater, E.C. and Anagliariello, E. Bari; Adriatica Editrice.
- 193.- Catell, K.J., Knight, I.G., Lindop, C.R. and Beechey, R.B. (1973) Biochem.J. 125, 169.
- 194.- Stekhoven, F.S., Waitkus, R.F. and Moerkerk, H.T.B. (1972) Biochemistry, 11, 1144.
- 195.- Capaldi, R.A. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 53, 1331
- 196.- Harold, F.M., Baarda, J.R. (1969) J.Biol.Chem., 244, 2261
- 197.- Roisin, M.P., Kepes, A. (1973) Biochim.Biophys.Acta, 305, 249.
- 198.- Rosen, B.P. (1973) J. Bacteriol, 116, 1124.

- 199.- Tobin, T., Hendersen, R. and Sen, A. (1972) *Biochim.Biophys. Acta*, 274, 550.
- 200.- Erdman, E. and Schoner, W. (1973) *Biochim.Biophys.Acta*, 307, 386
- 201.- Albers, R.W., Koval, G.I. and Siegel, G.I. (1968) *Mol.Pharmacol.* 4, 324.
- 202.- Skou, J.C. (1969) In *Molecular Basis of Membrane Function*. Ed. by Tosteson, D.C.
- 203.- Wolf, H.U. and Peter, H.W. (1972) *Biochim.Biophys,Acta*, 290, 310.
- 204.- Bulos, B. and Racker, E. (1968) *J.Biol.Chem.*, 243, 3891.
- 205.- Tzagoloff, A. (1970) *J.Biol.Chem.*, 245, 1545.
- 206.- Manning, G.B. and Campbell, L.L. (1961) *J.Biol.Chem.*, 236, 2952.
- 207.- Stearn, A.E. (1949) *Advanc. Enzymol.* 9, 25.
- 208.- Eyring, H. (1935) *J.Chem.Physiol.* 3, 107.
- 209.- Sweetman, A.I. and Friffliths, D.E. (1971) *Biochem.J.*, 121, 117.
- 210.- Taniguchi, K. and Iida, S. (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 274, 536.
- 211.- Grisham, C.M. and Barnett, R.E. (1973) *Biochemistry* 12, 2635.
- 212.- Raison, J.K. (1973) *Bioenergetics*, 4, 285.
- 213.- Kemp, A., Groot, G.S.P. and Reitsma, H.J. (1969) *Biochim. Biophys.Acta*, 180, 28.
- 214.- Zeglemaker, W.P., Jansen, H., Veeger, C. and Slater, E.C. (1971) *Biochim.Biophys.Acta*, 242, 14.
- 215.- Kimelberg, H.K., Papahadjopoulos, D. (1972) *Biochim.Biophys. Acta*, 282, 277.
- 216.- Futai, M. (1974) *J.Membrane Biol.* 15, 15.
- 217.- Knowles, A.F. and Penefsky, H.S. (1972) *J.Biol.Chem.* 247, 6624
- 218.- Mizushima, S. (1968) *J.Biochem.*, 63, 317.

- 219.- Ellar, D.J., Muñoz, E. and Salton, M.R.J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 225, 140.
- 220.- Azocar, E. (1974) Comunicación personal.
- 221.- Capaldi, R.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1331.
- 222.- Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. and Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2049.
- 223.- Lastras, M., Muñoz, E. (1972) *FEBS letters*, 21, 109.
- 224.- Muñoz, E. (1974) Comunicación personal.
- 225.- Charnock, J.S., Rosenthal, A.S. and Post, R.L. (1963) *Aust. J. Exp. Biol.* 41, 675.
- 226.- Peter, H.W. and Wolf, H.U. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 290, 300
- 227.- Senior, A.E. (1973) *Biochemistry*, 12, 3622.
- 228.- Philo, R.D. and Selwyn, M.J. (1973) *Biochem. J.*, 135, 525.
- 229.- Weiner, J.H. and Heppel, L.A. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6933.
- 230.- Berger, E.A. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 1514.
- 231.- Simoni, R.D. and Shallenberger, M.K. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 2663.
- 232.- Bragg, P.D. and Hou, C. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 729.
- 233.- Fessenden-Raden, J.M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6662.
- 234.- Lastras, M. Muñoz, E. Resultados sin publicar.
- 235.- Charnock, J.S., Cook, D.A., Almeida, A.F. and To, R. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 393.
- 236.- Tanaka, R. and Teruya, A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 584.
- 237.- Hegyvary, C. and Post, R.L. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 5234.

- 238.- Norby, J.G. and Jensen, I. (1971) Biochim.Biophys.Acta, 233, 104.
- 239.- Hilborn, D.A. and Hammes, G.G. (1973) Biochemistry, 12, 983.
- 240.- Catterall, W.A. and Pedersen, P.L. (1972) J.Biol.Chem. 247,
7969.